

Bestimmung der in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol
und Piperacillin/Tazobactam gegenüber sensiblen und resistenten *Bacteroides*
fragilis Stämmen mittels Absterbekinetik

Publikationspromotion
zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Matthias Funke
geb. am 30.06.1980 in Halle/Saale

angefertigt an: Universität Leipzig
Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Infektionsepidemiologie

Betreuer: PD Dr. med. habil. Reiner Schaumann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 Anaerobier	5
1.2 Infektionen durch obligate Anaerobier	5
1.3 Antibiotikawirkungen	8
1.3.1 β -Laktam-Antibiotika	8
1.3.1.1 Imipenem	9
1.3.1.2 Piperacillin/Tazobactam	10
1.3.2 Nitroimidazole	10
1.3.2.1 Metronidazol	11
1.3.3 Lincosamide	12
1.3.3.1 Clindamycin	12
1.4 Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von Anaerobiern	12
1.5 Untersuchungen zur Absterbekinetik	14
1.6 Zielstellung	16
2. Originalarbeit	17
2.1 Bestimmung der in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam gegenüber sensiblen und resistenten <i>Bacteroides fragilis</i> Stämmen mittels Absterbekinetik	17
3. Zusammenfassung	23
4. Thesen zur Dissertationsschrift	28
5. Literaturverzeichnis	29
6. Danksagung	38
7. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	39
8. Lebenslauf	40
9. Anhang	42

Bibliographische Beschreibung:

Name: Funke, Matthias

Titel: Bestimmung der in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam gegenüber sensiblen und resistenten *Bacteroides fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik

Universität Leipzig, Publikationspromotion

56 Seiten einschließlich eines publizierten Manuskriptes, 107 Literaturstellen und Anhang mit 2 Tabellen und 48 Abbildungen.

Referat:

Obligat anaerob wachsende Bakterien sind an einer Vielzahl von Infektionen beteiligt. Dabei ist *Bacteroides fragilis* einer der wichtigsten opportunistischen Erreger unter den Anaerobiern. Bei Verdacht auf eine Infektion durch obligate Anaerobier muss nach Materialentnahme für die mikrobiologische Diagnostik unverzüglich eine kalkulierte Therapie eingeleitet werden. Oft ist eine chirurgische Therapie notwendig, die ebenso wie eine adäquate Antibiotikatherapie entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist.

Wichtige Substanzen für eine Therapie bei Infektionen mit Beteiligung von *B. fragilis* sind Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam. Um Aussagen zur in vitro Wirksamkeit dieser Antibiotika gegenüber obligaten Anaerobiern treffen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Aktivitäten von verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums auf das Wachstum von sensiblen und resistenten *B. fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik untersucht. In Abhängigkeit von der zuvor ermittelten minimalen Hemmkonzentration des jeweiligen Antibiotikums wurden die Stämme in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfasst alle Stämme mit einer MHK $\leq 8 \mu\text{g/ml}$. In der zweiten Gruppe sind die Stämme mit einer MHK $> 8 \mu\text{g/ml}$ zusammengefasst. Die einzelnen Stämme wurden mit einem Vielfachen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) beziehungsweise einem Vielfachen der im menschlichen Blutplasma maximal erreichbaren Konzentration (C_{max}) des jeweiligen Antibiotikums inkubiert und die Bakterienkonzentration zu definierten Zeitpunkten ermittelt. Dadurch können sowohl die Wirksamkeit unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen als auch verschiedene Antibiotikaklassen miteinander verglichen und Aussagen zu Empfehlungen für kalkulierte Therapien getroffen werden.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung/Abbildungen
AUC	Area Under the Curve
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
C _{max}	maximal erreichbare Konzentration im menschlichen Blutplasma
DIN	Deutsches Institut für Normung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
KBE	koloniebildende Einheit
LPS	Lipopolysaccharid
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemmkonzentration
Nim-Gene	Nitroimidazole resistance Gene
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
RMA	Stammbezeichnung von <i>B. fragilis</i> Stämmen des R. M. Alden Research Laboratory, Santa Monica, CA, USA
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
t > MHK	Zeit in der die Antibiotikakonzentration über der MHK liegt
WAL R	Stammbezeichnung von <i>B. fragilis</i> Stämmen aus einer internationalen Anaerobierstudie

1. Einleitung

1.1. Anaerobier

Anaerobier sind Bakterien, die bis auf wenige Ausnahmen zum Überleben und Wachstum eine sauerstoffarme bzw. sauerstofffreie Atmosphäre benötigen (35). Dies ist unter anderem auf das Fehlen von Enzymen wie Superoxiddismutase und Katalase zurückzuführen. Unter aeroben Bedingungen entstehen in Kulturmedien und Zellen Wasserstoffperoxid, Superoxidradikale, Hydroxylradikale und Singuletsauerstoff als toxische Produkte des Sauerstoffs. Diese können unter anderem durch das Fehlen der genannten Enzyme nicht beseitigt werden und sind toxisch für die Mikroorganismen (25).

Bezüglich ihrer Aerotoleranz wurden die Anaerobier 1969 von Loesche in obligate, moderate und mikroaerophile Anaerobier eingeteilt (48). Erstere sterben bei Exposition zu Sauerstoff sehr schnell ab und können sich nur in einem anaeroben Milieu vermehren. Moderate Anaerobier tolerieren eine sauerstoffhaltige Atmosphäre bis zu einer Stunde und können auch bei einem geringen Sauerstoffgehalt der Umgebung wachsen. Die mikroaerophilen Anaerobier bevorzugen einen geringen Sauerstoffgehalt ihrer Umgebung (48).

Anaerobier besiedeln die Haut und die Schleimhäute von Menschen und Tieren (66). Dabei stellen die obligaten Anaerobier den größten Teil der sogenannten Standortflora dar (23, 85). Im Colon wird z.B. das Verhältnis von aeroben zu anaeroben Keimen mit 1:1000 angegeben (29).

1.2. Infektionen durch obligate Anaerobier

Als opportunistische Krankheitserreger können anaerobe Bakterien sowohl anaerobe Monoinfektionen als auch Mischinfektionen mit aeroben Bakterien verursachen (66, 89).

Diese Infektionen müssen häufig sowohl chirurgisch versorgt als auch mit Antibiotika behandelt werden. Die Antibiotikatherapie muss gegen Anaerobier und im Falle von Mischinfektionen sowohl gegen Anaerobier als auch gegen Aerobier wirksam sein (23, 30, 58, 61, 89).

Eine Infektion unter Beteiligung von anaeroben Bakterien sollte bei Vorliegen von typischen, schleimhautnahen Infektionslokalisationen, nach stattgehabter Aspiration, bei gestörter Blutzirkulation, nach Verletzungen oder Operationen, bei ausgedehnten Nekrosen, übelriechender Sekretion, Knistern im Gewebe durch Gasbildung, schwarzer Verfärbung, septischer Thrombophlebitis oder bei Sepsis mit Gelbsucht immer in Betracht gezogen werden (66, 89). Bakteriell bedingte intraabdominelle und gynäkologische Infektionen,

otorhinolaryngeale Entzündungen und Aspirationspneumonien sind häufig durch Anaerobier verursachte Mischinfektionen mit Beteiligung von obligaten und fakultativen Anaerobiern (61). Bei den weitaus meisten Infektionen unter Beteiligung von anaeroben Bakterien handelt es sich um endogene Infektionen. Hauptquellen sind Mundhöhle und Pharynx, der Gastrointestinaltrakt, dabei besonders das terminale Ileum und der Dickdarm, der Urogenitaltrakt und die Haut (66, 89). Ausnahmen hiervon sind z.B. Infektionen mit *Clostridium tetani*, *C. difficile* oder *C. botulinum* (63). In der Regel kommt es erst zu einer Infektion mit anaeroben Bakterien, wenn diese aufgrund einer Störung der Integrität von Haut- oder Schleimhautbarriere in primär sterile Bereiche eindringen können (66, 89, 103). Zu einer Vermehrung kann es dann kommen, wenn die Sauerstoffversorgung beeinträchtigt ist. Begünstigend für eine Infektion mit Anaerobiern wirken Traumata, chirurgische Eingriffe, Fremdkörper oder maligne Erkrankungen sowie Hypoxie, Schock oder Gewebsnekrosen. Weitere Risikofaktoren sind außerdem Diabetes mellitus, Angiopathien mit Durchblutungsstörungen, Malignome, Alkoholismus und Therapie mit Immunsuppressiva (26, 66, 78, 89). Bei 90 – 100% aller Zahn- und Mundinfektionen, in über 80% der Fälle von Hirnabszessen, in 85-95% der diabetischen Fußulzerationen, in 50-90% aller intraabdominellen Infektionen und in über 50% bei chronischer Sinusitis beziehungsweise Otitis media können Anaerobier nachgewiesen werden (26, 66). Bei diesen zumeist als Mischinfektion vorliegenden Infektionen von aeroben und anaeroben Bakterien konnten synergistische Effekte hinsichtlich der Pathogenität festgestellt werden (38, 68, 90). Zum einen vermehren sich bei beeinträchtigter Sauerstoffversorgung wahrscheinlich zunächst die fakultativ anaeroben Bakterien. Diese verbrauchen den noch vorhandenen Sauerstoff und schaffen dadurch eine Umgebung, in der sich obligat anaerobe Bakterien vermehren können (24, 53, 78). Zum anderen könnten auch immunmodulatorische Vorgänge zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort des Wirtsorganismus führen. So wird die Fähigkeit von Leukozyten und Makrophagen zur Phagozytose nach Kontakt mit *Bacteroides* spp. vermindert und die Stimulation von T- und B-Lymphozyten durch übliche Aktivatoren wie *E.coli*-LPS nicht mehr möglich (75, 77, 79).

Insgesamt werden in 0,5-9% aller Bakteriämien Anaerobier nachgewiesen. Die Letalität einer Sepsis mit Anaerobiern ist mit bis zu 50% hoch und stark von einem frühzeitigen Beginn einer adäquaten Antibiotikatherapie abhängig (28, 41, 81, 103).

Dabei ist *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) der am häufigsten nachgewiesene obligate Anaerobier (28, 81). *B. fragilis* gehört zur Familie der *Bacteroidaceae* und ist ein obligat anaerob wachsendes, gram-negatives, nichtsporenbildendes Stäbchenbakterium (78).

Innerhalb dieser Familie wird *B. fragilis* zur *B. fragilis* Gruppe gerechnet. Die Taxonomie der *Bacteroidaceae* hat seit der Beschreibung durch Knorr 1922 häufige Veränderungen erfahren (40, 57, 103). *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* und *B. vulgatus* gehören zur sogenannten klassischen *B. fragilis* Gruppe (35).

Aktuell umfasst die *B. fragilis* Gruppe mehr als 20 verschiedene Stämme (103). Obwohl *B. fragilis* nur etwa 0,5% der Standortflora im Darm ausmacht, spielt dieser Keim eine bedeutende Rolle bei Mischinfektionen mit Beteiligung von Anaerobiern (103, 107). So wird er beispielsweise in 30–60% aller intraabdominellen Infektionen gefunden (55, 62). Zusammen mit *E. coli* ist *B. fragilis* bei Peritonitis und anderen intraabdominellen Infektionen - ausgenommen der nekrotisierenden Pankreatitis, der primären Peritonitis und der Peritonitis bei kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse - der am häufigsten nachgewiesene Erreger (106).

Um bei der Therapie ausreichende Wirkspiegel im Infektionsgebiet zu erreichen und besonders bei Nekrosen und abgekapselten Abszessen die Durchblutung und damit die Sauerstoffversorgung zu verbessern, ist oft eine chirurgische Revision des Infektionsgebietes eine Voraussetzung für einen Therapieerfolg (58, 66).

Eine Empfindlichkeitstestung von Anaerobiern wird im klinischen Alltag häufig nicht routinemäßig durchgeführt (32, 61). Gründe hierfür sind die langsame Generationszeit, die oftmals polymikrobielle Natur von Anaerobierinfektionen, die hohen Kosten sowie die Komplexität der Testmethoden, das Fehlen eines allgemein anerkannten „Goldstandards“ und nicht zuletzt die Annahme, dass die Resistenzlage bei Anaerobierinfektionen vorhersagbar sei (23, 32, 61).

Bei schweren Infektionen unter Beteiligung von Anaerobiern ist die unverzügliche Einleitung einer kalkulierten Antibiotikatherapie notwendig, da eine Verzögerung des Therapiebeginns mit einer Erhöhung der Letalität verbunden ist (41, 66, 81). Um Empfehlungen für eine kalkulierte Antibiotikatherapie aussprechen zu können, muss auf epidemiologische Kenntnisse und Daten aus Studien zur Empfindlichkeit der Erreger zurückgegriffen werden. Eine Vielzahl von Studien beschreibt inzwischen Resistenzen von Anaerobiern gegenüber häufig verwendeten Antibiotika. Dabei bestehen Unterschiede sowohl zwischen verschiedenen geographischen Regionen als auch zwischen verschiedenen Gesundheitseinrichtungen und sogar innerhalb einzelner Einrichtungen. Dies unterstreicht sowohl die Bedeutung von fundierten epidemiologischen Kenntnissen in der jeweiligen Region und Gesundheitseinrichtung als auch die Notwendigkeit von

Empfindlichkeitsbestimmungen sowohl von Aerobiern als auch von Anaerobiern in der Routinediagnostik (4, 23, 32, 57, 61, 69, 83, 84, 93, 103).

1.3. Antibiotikawirkungen

Die Antibiotikatherapie hat das Ziel, durch Abtötung pathogener Erreger eine klinische Besserung zu erzielen (64). Antibiotika können auf verschiedene Weise den Stoffwechsel von Bakterien hemmen. Sie können die Bildung der Bakterienzellwand stören und Zellwandaautolysine aktivieren, die Proteinsynthese, die RNA- bzw. DNA-Synthese oder zum Beispiel die Folatsynthese hemmen oder auch die Zytoplasmamembran schädigen. Dabei können einzelne Antibiotika auch über mehrere Wirkmechanismen verfügen (51, 60, 98, 105). Eine bakterizide Wirkung bedeutet nach DIN eine Abtötung von $\geq 99,9\%$ der eingebrachten Bakterien innerhalb einer definierten Einwirkzeit. Die niedrigste Wirkstoffkonzentration, die dies erreicht, wird als minimale bakterizide Konzentration (MBK) bezeichnet (13).

Die Möglichkeiten einer effektiven antibiotischen Therapie unter Einschluss der *B. fragilis* Gruppe sind begrenzt. Aminoglykoside werden beispielsweise nicht intrazellulär aufgenommen und erreichen somit nicht ihre Zielstruktur (8). Weitere Resistenzmechanismen sind die Bildung von Betalaktamasen, die Veränderung der Penicillin-bindenden Proteine als Zielstruktur, aktiver Efflux durch Effluxpumpen, Barrieren für die Penetration des Antibiotikums in das Innere des Bakteriums oder alternative Stoffwechselwege (50, 99). Betalaktamasen werden bei nahezu allen Bacteroides Spezies gefunden. Diese können sowohl Penicilline, vor allem aber auch Cephalosporine inaktivieren (72, 80).

Zu den Substanzen mit bekannter Wirksamkeit gegen die Vertreter der *B. fragilis* Gruppe gehören durch Betalaktamase geschützte Penicilline, Carbapeneme, Clindamycin, Metronidazol sowie einige neuere Fluorochinolone (66, 88, 103).

1.3.1. β -Laktam-Antibiotika

Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame gehören zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika. Dabei sind Penicilline mit und ohne Kombination mit einem Betalaktamaseinhibitor und auch Carbapeneme, nicht aber die meisten Cephalosporine gegen Anaerobier wirksam.

Die Wirkung der β -Laktam-Antibiotika entsteht durch die Bindung an die Penicillin-bindenden Proteine der Bakterien. Diese sind für Elongation und Vernetzung der Peptidoglykane der Zellwand verantwortlich. Somit werden Zellwandbildung und Zellwachstum verhindert und Zelllyse und Zelltod bei proliferierenden Bakterien

herbeigeführt. Unterschiede in der Wirkung ergeben sich unter anderem durch unterschiedliche Affinität zu den Penicillin-bindenden Proteinen der Bakterien, Unterschiede in Penetrationsfähigkeit durch die Bakterienwand sowie durch Unterschiede in der Betalaktamasefestigkeit (76, 91, 98).

1.3.1.1. Imipenem

Imipenem ist ein β -Laktam-Antibiotikum und gehört zur Gruppe der Carbapeneme. Imipenem wird beim Menschen immer zusammen mit Cilastatin verabreicht. Letzteres ist notwendig, um einen schnellen Abbau von Imipenem durch das Enzym Dehydropeptidase-1 in den Nieren zu verhindern. Cilastatin hemmt die Dehydropeptidase-1 kompetitiv und verhindert so die Hydrolyse des Imipenems (33, 76).

Imipenem besitzt Wirksamkeit gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen. Das Spektrum umfasst sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien, Anaerobier und Aerobier (36, 76). Der PK/PD-Parameter $t > \text{MHK}$ ist bei Carbapenemen am besten als Indikator der zu erwartenden Wirksamkeit geeignet (76).

Resistenzen gegenüber Imipenem können auf Veränderungen an den Membrankanälen der Bakterienwand, den sogenannten Porinen, beruhen, wodurch das Antibiotikum nicht mehr in die Bakterienzelle penetrieren kann, oder auf Änderungen an den Penicillin-bindenden Proteinen, dem Angriffspunkt des Antibiotikums. Ein anderer Resistenzmechanismus ist die Produktion von speziellen Betalaktamasen. Diese werden auch als Carbapenemasen bezeichnet. Es wurden zu den Metallo- β -Laktamasen gehörende Enzyme mit den Typen IMP und VIM sowie die Neu-Dehli Metallo- β -Laktamase NMD-1 beschrieben. Metallo- β -Laktamasen gehören zur Gruppe B nach Ambler und benötigen ein Zinkion für die enzymatische Aktivität. Sie sind in der Lage, viele β -Laktam-Antibiotika inklusive Carbapeneme zu hydrolysieren. Die Metallo- β -Laktamase vom Typ IMP wurde zuerst bei *B. fragilis* gefunden, der Typ VIM bei *Pseudomonas* und Enterobacteriaceae. Außerdem haben Carbapenemasen der Klasse A nach Ambler, wie z.B. KPC-1, KPC-2 oder KPC-3, klinische Bedeutung (3, 15, 44, 71, 76, 80, 100).

Die Bildung von Effluxpumpen spielt bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Imipenem eine untergeordnete Rolle (45). Resistenzen innerhalb der *B. fragilis* Gruppe gegenüber Imipenem sind selten. In Europa und den USA wird die Rate mit $< 1\%$ angegeben (32, 93).

Aufgrund seiner breiten Wirksamkeit ist Imipenem eines der wichtigsten Antibiotika in der Therapie von schweren polymikrobiellen Infektionen, von aeroben/anaeroben

Mischinfektionen und in der kalkulierten Initialtherapie potentiell lebensbedrohlicher Infektionen. Entsprechend wird Imipenem in der Therapie von intraabdominellen, gynäkologischen und urogenitalen Infektionen, neutropenischem Fieber, Infektionen der unteren Atemwege, beatmungsassoziierter Pneumonie, Haut-, Schleimhaut-, Knochen- und Gelenkinfektionen sowie bei Endokarditis und Sepsis eingesetzt (21, 39, 59, 76).

1.3.1.2. Piperacillin/Tazobactam

Piperacillin zählt ebenfalls zu den β -Laktam-Antibiotika und ist ein halbsynthetisches Ureidopenicillin mit erweitertem Spektrum, welches auch Anaerobier umfasst. Allerdings kann Piperacillin durch die Betalaktamasen von *B. fragilis* hydrolysiert werden (91). Tazobactam ist ein Betalaktamasehemmer und kann in Kombination mit Piperacillin dessen Aktivität und Spektrum erweitern. Dabei hat Tazobactam selbst kaum antibakterielle Aktivität. Es bindet sich kovalent an die meisten plasmidvermittelten und viele chromosomal vermittelten Betalaktamasen und hemmt diese irreversibel (31, 34, 91).

Der PK/PD-Parameter $t > \text{MHK}$ ist zur Beschreibung der zu erwartenden Wirksamkeit geeignet (1). Resistenzen der *B. fragilis* Gruppe gegenüber Piperacillin/Tazobactam sind mit $< 1\%$ in Europa und den USA analog der Resistenzen gegenüber Imipenem selten. Ausnahmen sind die Schweiz und Großbritannien. Hier wurden 6% bzw. 5% der getesteten *B. fragilis* Stämme als resistent eingestuft (23, 32). Piperacillin/Tazobactam wird zur Therapie bei Infektionen des unteren Respirationstraktes, der Harnwege, gynäkologischen Infektionen, Infektionen von Haut und Weichteilen, bei intraabdominellen Infekten und bei Patienten mit neutropenischem Fieber eingesetzt. Prinzipiell wird Piperacillin gut vertragen. Die häufigsten Nebenwirkungen sind gastrointestinale Symptome sowie Hautreaktionen (70, 91).

1.3.2. Nitroimidazole

Nitroimidazole wirken auf den anaeroben Stoffwechsel. Sie sind aktiv gegen Anaerobier und Protozoen (98).

Vertreter der Nitroimidazole sind Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol und Nimorazol. Alle Antibiotika dieser Gruppe verfügen über eine Nitrogruppe. Durch Reduktion der Nitrogruppe entsteht ein kurzlebiges freies Radikal. Dieses bindet unspezifisch an die bakterielle DNA und führt zu Strangbrüchen und zur Destabilisierung der Helix. Letztlich kommt es zum Zelltod, nicht jedoch zu einer Zelllyse (14, 98).

Klinische Bedeutung besitzt in der Gruppe der Nitroimidazole lediglich Metronidazol.

1.3.2.1 Metronidazol

Metronidazol gelangt als Prodrug über passive Diffusion in die Zelle. Die Aktivierung erfolgt im Zytoplasma der Bakterien. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, umfasst jedoch die Hemmung der DNA-Synthese und Schädigung der DNA durch Oxidation (14, 42, 46). Die am Reduktionsprozess beteiligten Elektronendonoren unterscheiden sich in anaeroben und aeroben Zellen erheblich. Anaerobe Bakterien gewinnen ihre Energie über den Pyruvat-Ferredoxin-Komplex, dessen Reduktionspotential unter dem des Metronidazolmoleküls liegt. Somit wird Metronidazol als besserer Elektronenakzeptor reduziert. Aerobe Zellen verfügen über keine Proteine, deren Reduktionspotential unter dem des Metronidazolmoleküls liegt. Dies erklärt die Unwirksamkeit von Metronidazol gegenüber aeroben Bakterien. Eine Ausnahme bilden mikroaerophile Organismen wie *Helicobacter pylori*. Weiterhin können unter Anwesenheit von Sauerstoff bereits aktivierte Metronidazolmoleküle durch Oxydation zurück in ihre inaktive Form überführt werden (46, 73). Aus diesem Grund müssen in vitro Untersuchungen zu Metronidazol unter anaeroben Bedingungen stattfinden. Die PK/PD-Parameter AUC/MHK und C_{\max} /MHK korrelieren gut mit der zu erwartenden Wirksamkeit von Metronidazol (1).

Resistenzen gegenüber Metronidazol resultieren aus Änderungen der Membranproteine und somit verminderter Aufnahme in die Zelle, reduzierter Effektivität der Aktivierung durch verminderte Aktivität des Pyruvat-Ferredoxin-Oxyreduktase-Komplexes, Verminderung der Wechselwirkungen mit der DNA beziehungsweise erhöhter Reparaturkapazität, Inaktivierung durch Enzyme oder erhöhtem aktiven Efflux (7, 18, 42, 46, 49).

Das Vorhandensein von Nim-Genen im Bakteriengenom wird in Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber Metronidazol gebracht (47, 102). Die Nitroimidazole resistance Gene (Nim-Gene) kodieren eine alternative Reduktase, welche Nitroimidazole in eine nicht toxische Form umwandeln kann. Diese erzeugt keine DNA-Brüche (43, 73). Derzeit sind 7 verschiedene Nim-Gene (NimA - NimG) bekannt (47, 86). Die Anwesenheit von Nim-Genen gilt als Risikofaktor für verminderte Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol, jedoch sind Nim-Gene nicht zwangsläufig mit dem Vorhandensein von Resistenzen vergesellschaftet (86). Außerdem können Resistenzen gegenüber Metronidazol auch in nim-negativen *B. fragilis* Stämmen auftreten (47, 86). Metronidazol wird seit 40 Jahren bei Infektionen durch Anaerobier eingesetzt. Dennoch sind Resistenzen in Europa mit < 1% sehr selten. Die höchste Resistenzrate fand sich in Großbritannien mit 7% der untersuchten *B. fragilis* Stämme (23, 32).

1.3.3. Lincosamide

Lincosamide sind gegenüber Staphylokokken, Pneumokokken und Anaerobiern wirksam (98). Erster Vertreter der Gruppe der Lincosamide war Lincomycin. Dieses besitzt nur noch historische Bedeutung, da das aus dem Lincomycin abgeleitete halbsynthetische Derivat Clindamycin besser resorbiert wird und in vitro eine bessere Wirksamkeit besitzt (98).

1.3.3.1 Clindamycin

Die Wirkung von Clindamycin erfolgt über eine Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen und führt damit zu einer Hemmung der Proteinsynthese. Abhängig von der Konzentration am Ort der Infektion und von der Empfindlichkeit der Erreger kann Clindamycin bakteriostatisch oder bakterizid wirken (52, 98, 101). Resistenzen können durch Methylierung des Angriffspunktes an der 50S-Untereinheit der Ribosomen entstehen. Dies führt häufig zu einer Resistenz sowohl gegenüber Makroliden als auch gegenüber Streptogramin B und wird MLS_B-Resistenz genannt (94, 96). Wichtiger PK/PD-Parameter für die zu erwartende Wirksamkeit von Clindamycin ist AUC/MHK (1).

Bei Infektionen wie Empyem, Lungen- und intraabdominalen Abszessen und Peritonitis mit Beteiligung von Anaerobiern galt Clindamycin lange Zeit als Mittel der ersten Wahl. Inzwischen beschreibt eine Vielzahl von Studien insbesondere innerhalb der *B. fragilis* Gruppe zunehmende Resistenzen gegenüber Clindamycin. In europäischen Ländern werden innerhalb der *B. fragilis* Gruppe Resistenzraten zwischen 0% und 40% beschrieben (32). In Spanien wurden sogar 49% der getesteten *B. fragilis* Stämme als resistent eingestuft (23, 69). Clindamycin sollte aufgrund des Anstiegs von Resistenzen nicht mehr zur Therapie von Infektionen durch obligate Anaerobier ohne Empfindlichkeitstestung verwendet werden. (23, 82).

1.4. Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von Anaerobiern

Ziel der Empfindlichkeitstestung ist es, anhand bestimmter Parameter Therapieempfehlungen aussprechen zu können (71).

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ist ein wichtiger und weithin etablierter Parameter bei der Empfindlichkeitstestung von Bakterien (74, 89). Die MHK-Bestimmung erfasst die Wirkung einer konstanten Konzentration eines Antibiotikums auf eine Bakterienkonzentration zu einem definierten Zeitpunkt. Aussagen über Rate und Ausmaß einer Bakterienabtötung sind mittels MHK nicht möglich. Ebenso wenig kann geschlussfolgert werden, ob höhere Antibiotikakonzentrationen oberhalb der MHK die

Wirksamkeit verbessern oder ob eine teilweise Hemmung des bakteriellen Wachstums unterhalb der MHK erreicht wird. Ein Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Antibiotikaklassen untereinander ist allein durch den Parameter MHK ebenfalls nicht möglich (54, 94). Um anhand der MHK Aussagen über einen möglichen Therapieerfolg machen zu können, erfolgt eine Bewertung der Empfindlichkeitsbestimmung über festgelegte Grenzwerte in „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“. Eine Bewertung als „sensibel“ erfolgt nach DIN 58940-1, wenn die ermittelte MHK so gering ist, dass bei geeigneter Indikation und Therapie mit üblichen Dosierungen ein Erfolg zu erwarten ist. Die Bewertung „intermediär“ erfolgt dann, wenn die ermittelte minimale Hemmkonzentration in einem Bereich zwischen 2 Grenzwerten liegt und ohne weitere Kriterien keine Aussage über den zu erwartenden Therapieerfolg möglich ist. „Resistent“ bedeutet, dass die MHK so hoch liegt, dass auch bei Verwendung der zugelassenen Höchstdosierungen eines Chemotherapeutikums ein Therapieerfolg nicht zu erwarten ist (13).

Die Grenzwerte für die Bewertung der MHK werden durch Fachgesellschaften unter Beachtung vieler Daten festgelegt. Für die jeweilige Substanz werden unter anderem Indikationsgebiete, Dosierung, pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter, mögliche konzentrationsabhängige Toxizität, die Ergebnisse klinischer Prüfungen und Analysen von Fällen mit Therapieversagen berücksichtigt (74). Eine Kombination von Monte-Carlo-Simulationen aus der Pharmakokinetik, in der Probandendaten auf große Kollektive übertragen werden und tierexperimentellen Daten aus der Pharmakodynamik ist dabei für die Festlegung der Grenzwerte wegweisend (16, 74). Durch die Vielfalt der zu berücksichtigenden Daten müssen Argumente abgewogen und Substanzen in die bestehenden Grenzwerte eingeordnet werden. Die Grenzwertfestlegung kann somit nicht immer ein exakt wissenschaftlich begründeter Vorgang sein sondern beruht oft auch auf Kompromissen. Zudem können sich die Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung und daher auch die Grenzwerte von Land zu Land unterscheiden (10, 13, 22, 37, 74).

Geeignete Methoden für die MHK-Bestimmung bei Anaerobiern sind Bouillon-Dilutionsverfahren sowie Gradientendiffusionstest, wie zum Beispiel der E-Test. Eine weitere Möglichkeit der Empfindlichkeitstestung bei Anaerobiern ist die Agardilution. Im Gegensatz dazu sind Agar-Diffusionsverfahren, bei denen sich durch die Diffusion eines Wirkstoffes ein festes beimpftes Kulturmedium wachstumsfreie Hemmhöfe ergeben, in Bezug auf Anaerobier weniger geeignet. Bei den langsam wachsenden Erregern korrelieren die Ergebnisse nicht sehr gut mit denen der anderen standardisierten Verfahren (2, 13, 67).

Zur Durchführung der Bouillon-Dilutionsmethode wird eine geometrische Verdünnungsreihe einer Antibiotikallösung erstellt. Jeweils ein neues Behältnis wird mit gleichem Volumen, jedoch geometrisch absteigender Konzentration des Wirkstoffes, mit einem festgelegten Volumen einer Bouillon sowie mit einem die Bakterien enthaltenden, definierten Inokulum beschickt und anschließend bebrütet. Die MHK ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, die in der Lage ist, das Bakterienwachstum zu hemmen. Diese Bestimmung kann nach DIN 58940-5 als Makrodilution mit einem Testvolumen von mindestens 2 ml oder nach DIN 58940-8 als Mikrodilution mit einem Testvolumen von weniger als 0,5 ml durchgeführt werden (13).

Für die Durchführung einer Agar-Dilution wird ein Antibiotikum in geometrisch abgestuften Konzentrationen in feste oder halbfeste Agar-Medien inkorporiert und das Inokulum auf die Oberfläche aufgetragen. Die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, die das Wachstum der Mikroorganismen hemmt, ist die MHK (13).

Anstelle der aufwändigen Dilutionsverfahren hat sich die Bestimmung der MHK mittels Gradientendiffusionstest bewährt. Ein Beispiel hierfür ist der E-Test. Auf einen Plastik-Carrier-Streifen wird dazu ein Antibiotikum so aufgebracht, dass ein Konzentrationsgradient entsteht. Nach Aufbringen des Streifens auf ein Agar-Medium diffundiert das Antibiotikum in das Medium. Durch Hemmung des Bakterienwachstums bildet sich ein ellipsenförmiger Hemmhof, der den Carrier-Streifen an einem Punkt schneidet. Hier kann dann unmittelbar die MHK an einer Skala abgelesen werden. Mittels E-Test können die für eine Therapie wichtigen Substanzen einzeln getestet werden. Ebenso können durch Auswahl geeigneter Medien die Ansprüche obligat anaerob wachsender Keime erfüllt werden. Die Bestimmung der Empfindlichkeit mittels E-Test korreliert dabei gut mit den erwähnten Dilutionsmethoden (5, 9).

1.5. Untersuchungen zur Absterbekinetik

Mittels Absterbekinetik können Daten über Wachstums- beziehungsweise Abtötungsraten von anaeroben Bakterienkulturen in vitro erhoben werden. Mit Hilfe dieser Daten können Vorhersagen über einen zu erwartenden Therapieerfolg in vivo getroffen werden (95, 97).

Mit Hilfe von Absterbekinetiken kann das Verhalten von sensiblen und resistenten Stämmen unter Exposition mit einer konstanten Konzentration eines Antibiotikums dargestellt und verglichen werden. Neben der Verwendung von Antibiotikakonzentrationen, die einem Vielfachen der MHK entsprechen ist auch die Verwendung von subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen möglich. Anstelle eines Vielfachen der MHK kann auch ein

Vielfaches der im menschlichen Blutplasma maximal erreichbaren Konzentration eines Antibiotikums verwendet werden. Die Absterbekinetik ist außerdem ein geeignetes Werkzeug, um eine Toleranz von Bakterienstämmen gegenüber einem bestimmten Antibiotikum darzustellen (6). Mit Hilfe von Absterbekinetiken ist ein Vergleich von verschiedenen Antibiotikaklassen möglich (11, 56, 100).

Die Ergebnisse dieses in vitro Modells lassen sich jedoch nicht ohne Weiteres auf die direkte Anwendung am Patienten übertragen. Zum Einen kann die Wirkung des Immunsystems nicht erfasst werden (12, 56). Zum Anderen entspricht die Verwendung einer konstanten Antibiotikakonzentration nicht der Situation in vivo mit schwankenden Konzentrationen. Um Letztere besser zu beschreiben, können Pharmakokinetisch/Pharmakodynamische-Modelle (PK/PD-Modelle) eingesetzt werden. Dabei werden die Antibiotikakonzentrationen über die Zeit verändert, um die Verhältnisse im menschlichen Blutplasma besser abzubilden (56, 100). Weiterhin werden verschiedene Parameter der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (PK/PD-Parameter) herangezogen, um Aussagen zu einer zu erwartenden Wirksamkeit eines Antibiotikums zu ermöglichen. Das Verhältnis von maximaler Konzentration im Serum und MHK (C_{\max}/MHK), das Verhältnis der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 Stunden zur MHK (AUC/MHK) und die Zeitdauer oberhalb der MHK ($t > \text{MHK}$) sind häufig verwendete PK/PD-Parameter (1, 71).

Mittels PK/PD-Modellen können allerdings keine Untersuchungen über die Wirkung unterschiedlicher, über die Zeit konstanter Antibiotikakonzentrationen gegenüber resistenten und sensiblen Stämmen einschließlich subinhibitorischer Konzentrationen durchgeführt werden. Hier bietet sich die Untersuchung mittels Absterbekinetik an.

1.6. Zielstellung

B. fragilis ist der bei Anaerobierinfektionen am häufigsten nachgewiesene obligate Anaerobier. Liegt eine schwere Infektion mit Beteiligung von Anaerobiern vor, muss unverzüglich eine adäquate kalkulierte Antibiotikatherapie begonnen werden. Eine Verzögerung des Therapiebeginns geht mit einer erhöhten Letalität einher.

Dabei sind Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam Antibiotika, die aufgrund ihres Wirkspektrums in der kalkulierten Therapie von Anaerobierinfektionen eingesetzt werden. Eine Vielzahl von Studien beschreibt inzwischen Resistenzen von Anaerobiern gegenüber diesen häufig verwendeten Antibiotika, insbesondere Clindamycin.

Mittels MHK-Bestimmung kann die Aktivität von Antibiotika gegenüber Bakterien bestimmt werden. Untersuchungen zur Absterbekinetik ermöglichen darüber hinaus Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Antibiotikawirkung. Verschiedene Konzentrationen eines Antibiotikums, beispielsweise auch subinhibitorische und therapeutisch erreichbare Konzentrationen, können bezüglich ihrer Aktivität miteinander verglichen werden. Ein Vergleich von verschiedenen Substanzklassen ist mittels Absterbekinetik möglich. In die Bewertung der MHK-Werte in „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ gehen solche Daten mit ein. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam gegenüber 12 *B. fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik über 24 Stunden bestimmt und miteinander verglichen. So kann die Aktivität der vier Antibiotika untereinander und die Wirkung von subinhibitorischen und hohen Konzentrationen auf sensible und resistente *B. fragilis* Stämme verglichen werden. Weiterhin können dadurch Aussagen zur Therapieempfehlung von Infektionen mit obligaten Anaerobiern getroffen werden.

2. Originalarbeit

2.1. Bestimmung der in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam gegenüber sensiblen und resistenten *Bacteroides fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivitäten von verschiedenen Konzentrationen von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam auf das Wachstum von sensiblen und resistenten *B. fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik untersucht. Dadurch sind ein Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen eines Antibiotikums und der Vergleich der verschiedenen Antibiotikaklassen miteinander möglich.

R. Schaumann und M. Funke haben gleichberechtigt zur Veröffentlichung beigetragen.

***In Vitro* Activities of Clindamycin,
Imipenem, Metronidazole, and
Piperacillin-Tazobactam against
Susceptible and Resistant Isolates of
Bacteroides fragilis Evaluated by Kill
Kinetics**

Reiner Schaumann, Matthias Funke, Eva Janssen and Arne
C. Rodloff

Antimicrob. Agents Chemother. 2012, 56(6):3413. DOI:
10.1128/AAC.00099-12.

Published Ahead of Print 19 March 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://aac.asm.org/content/56/6/3413>

These include:

REFERENCES

This article cites 28 articles, 16 of which can be accessed free
at: <http://aac.asm.org/content/56/6/3413#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://aac.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

In Vitro Activities of Clindamycin, Imipenem, Metronidazole, and Piperacillin-Tazobactam against Susceptible and Resistant Isolates of *Bacteroides fragilis* Evaluated by Kill Kinetics

Reiner Schaumann, Matthias Funke, Eva Janssen, and Arne C. Rodloff

Institute for Medical Microbiology and Epidemiology of Infectious Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany

The aim of the present study was to investigate the activities of clindamycin, imipenem, metronidazole, and piperacillin-tazobactam against 12 *Bacteroides fragilis* isolates (resistant and susceptible strains) by kill kinetics over 24 h. In contrast to the other antimicrobial agents, clindamycin did not affect strains with MICs of >8.0 $\mu\text{g/ml}$. For those strains with MICs of ≤ 8.0 $\mu\text{g/ml}$, all employed antibiotics except clindamycin showed nearly bactericidal activity. Metronidazole proved to be the most active antimicrobial agent.

Antimicrobial regimes for infections involving *Bacteroides fragilis* have generally been limited as *B. fragilis* strains are potentially resistant to a broad range of antibiotics (28). Drugs with known activity against *B. fragilis* are some β -lactams, nitroimidazoles such as metronidazole, certain newer quinolones, chloramphenicol, and clindamycin (17, 20, 23, 24, 28, 29). A diminution of susceptibility to clindamycin has been reported in various countries (1, 7, 21, 26). Resistance against metronidazole still seems to be rare (1, 3). Golan et al. found an increasing fluoroquinolone resistance among *Bacteroides* since 1994 (9). Conversely, Snyderman et al. reported in 2002 decreased geometric mean MICs among *B. fragilis* strains for piperacillin-tazobactam (26). Resistance to carbapenems can be found occasionally (28). Thus, there is a great need for knowledge of resistance patterns to accomplish an adequate prophylaxis and treatment of anaerobic or mixed aerobic/anaerobic infections. This seems even more important as there are great differences in the levels of antimicrobial resistance between certain geographic areas and even from one hospital to another (7, 10, 17). Kill kinetic curves over time provide more information than the widely used MIC determination and allow a comparison of different antimicrobial classes (16, 27). Thus, the aim of the present study was to investigate the *in vitro* activities of clindamycin, imipenem, metronidazole, and piperacillin-tazobactam against *B. fragilis* isolates by kill kinetics over time. The strains either were kindly provided by Elli Goldstein, R. M. Alden Research Laboratory, Santa Monica, CA, or were isolates from an international anaerobe study.

Brucella broth (Becton, Dickinson, Cockeysville, MD) supplemented with vitamin K₁ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and hemin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany) was used as growth medium and is referred to below as supplemented brucella broth. Aliquots were plated on Columbia agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) supplemented with sheep blood (Oxoid GmbH, Wesel, Germany), vitamin K₁, and hemin; this mixture is referred to below as supplemented Columbia agar.

MIC values were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) for all selected *B. fragilis* strains and clindamycin, imipenem, metronidazole, and piperacillin-tazobactam according to the manufacturer's instructions as described previously (25). For the *B. fragilis* strains with MICs of ≤ 8.0 $\mu\text{g/ml}$, the killing activities of

clindamycin (Sigma Chemical Co.), imipenem (Merck & Co., Inc., West Point, PA), metronidazole (Sigma Chemical Co.), and piperacillin (Sigma Chemical Co.)-tazobactam (Otsuka Chemical Co. Ltd., Osaka, Japan) were assessed using 0.5 \times , 1 \times , 2 \times , or 4 \times MIC. In the case of strains with MICs of >8.0 $\mu\text{g/ml}$, concentrations at 0.5 \times , 1 \times , 2 \times , or 4 \times maximum concentrations of drug in serum (C_{max}) were employed. The indicated concentrations were used as C_{max} : clindamycin, 16 $\mu\text{g/ml}$ (8); imipenem, 32 $\mu\text{g/ml}$ (22); metronidazole, 16 $\mu\text{g/ml}$ (11, 13, 15); piperacillin, 60 $\mu\text{g/ml}$ (2); and tazobactam, 25 $\mu\text{g/ml}$ (12, 14, 19).

An assay with antibiotic-free growth control was performed parallel to each experiment. The final inocula contained approximately 1.5×10^7 CFU/ml. At 0, 2, 4, 6, 12, and 24 h after incubation at 37°C, aliquots were plated on the supplemented Columbia agar. CFU were counted after 48 h of incubation. The detection limit was 10^2 CFU/ml. All experiments were carried out in an anaerobic chamber (Heraeus, Hanau, Germany) containing 5% H₂, 15% CO₂, and 80% N₂.

For all strains and their respective antimicrobial agents, the mean value and standard deviation were calculated. Statistical analysis was done with SPSS software. In those cases where the number of strains exceeded 3, the paired-sample Wilcoxon signed-rank test was employed to identify significant differences. In each case, at $t = 6$ h and $t = 24$ h differences were calculated. A P value of <0.05 was considered to be significant.

Table 1 shows the MIC values for the tested *B. fragilis* strains for the respective antimicrobial agent and the breakpoints according to EUCAST (6). The investigated strains were divided by a cutoff at 8.0 $\mu\text{g/ml}$ into two groups: the susceptible/wild-type group and the resistant group, respectively. For clindamycin, the same cutoff

Received 14 January 2012 Returned for modification 1 February 2012

Accepted 9 March 2012

Published ahead of print 19 March 2012

Address correspondence to Reiner Schaumann, reiner.schaumann@medizin.uni-leipzig.de.

R.S. and M.F. contributed equally to this work.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00099-12

TABLE 1 MICs ($\mu\text{g/ml}$) of the *B. fragilis* strains tested and breakpoints according to EUCAST (6)^a

<i>B. fragilis</i> strain	Clindamycin, ≤ 4 (s)/ >4 (r)	Imipenem, ≤ 2 (s)/ >8 (r)	Metronidazole, ≤ 4 (s)/ >4 (r)	Piperacillin-tazobactam, ≤ 8 (s)/ >16 (r)
WAL 13174	0.03	0.5	>256	2
RMA 5935	0.03	>32	0.25	>256
RMA 5120	1	0.25	0.5	0.125
RMA 5081	2	0.25	1	4
WAL 13054	2	0.25	>256	1
RMA 6600	2	>32	0.5	32
WAL 13267	4	0.125	0.5	0.5
RMA 0309	4	>32	0.5	>256
RMA 5798	8	0.125	0.5	4
RMA 5691	8	0.25	1	16
RMA 5138	>256	0.5	0.5	2
RMA 6791	>256	0.5	1	1

^a s, susceptible; r, resistant.

is used independently of the breakpoint (4 $\mu\text{g/ml}$) according to EUCAST (6). The chosen cutoff at 8.0 $\mu\text{g/ml}$ also separates two different groups, the wild-type and the resistant groups.

The pooled kill kinetic curves for *B. fragilis* strains with MICs of ≤ 8.0 $\mu\text{g/ml}$ are shown in Fig. 1. At concentrations above the MIC, clindamycin showed bactericidal activity against only 5 out of 10 strains. Imipenem was bactericidal against 8 out of 9 strains, and

metronidazole was bactericidal against 10 out of 10 strains. Piperacillin-tazobactam showed bactericidal activity against 6 out of 8 strains investigated. Piperacillin-tazobactam was the only antibiotic regime in which statistically significant differences were found after 6 h of incubation. The use of 4 \times MIC resulted in a higher killing rate than the use of 1 \times MIC ($P < 0.05$). A significantly higher killing rate using 1 \times MIC or 4 \times MIC instead of 0.5 \times MIC and clindamycin or imipenem, respectively, occurred at $t = 24$ h ($P < 0.05$). Between 1 \times MIC and 4 \times MIC, no statistical significances were found for clindamycin or imipenem, respectively. In contrast, increasing concentrations of metronidazole or piperacillin-tazobactam resulted in significantly higher killing rates after 24 h ($P < 0.05$).

The pooled kill kinetic curves for *B. fragilis* strains with MIC values of >8.0 $\mu\text{g/ml}$ are shown in Fig. 2. The two metronidazole-resistant strains were effectively killed by metronidazole when concentrations of C_{max} (16 $\mu\text{g/ml}$) or more were used. Also, two of three imipenem-resistant strains were killed by imipenem with concentrations of C_{max} (32 $\mu\text{g/ml}$) or more. Piperacillin-tazobactam showed activity against 3 of the 4 piperacillin-tazobactam-resistant strains when concentrations of C_{max} (piperacillin, 60 $\mu\text{g/ml}$, and tazobactam, 25 $\mu\text{g/ml}$) or higher were used. In contrast, clindamycin did not inhibit the bacterial growth of the clindamycin-resistant strains even at concentrations of 4 \times C_{max} (64 $\mu\text{g/ml}$). Due to the limited number of strains with MICs of >8 $\mu\text{g/ml}$, statistical analysis could be performed only for piperacillin-tazo-

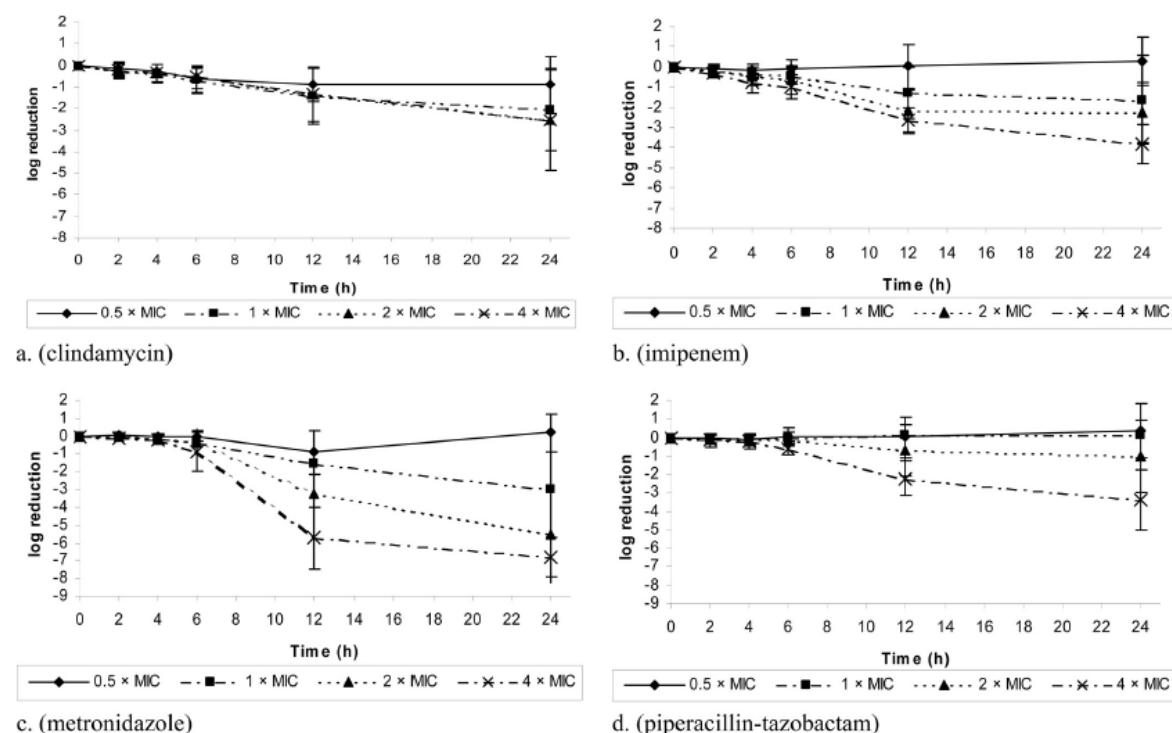


FIG 1 Pooled kill kinetic curves of 10 *B. fragilis* strains and clindamycin (a), 9 *B. fragilis* strains and imipenem (b), 10 *B. fragilis* strains and metronidazole (c), and 8 *B. fragilis* strains and piperacillin-tazobactam (d) for strains with MICs of ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$.

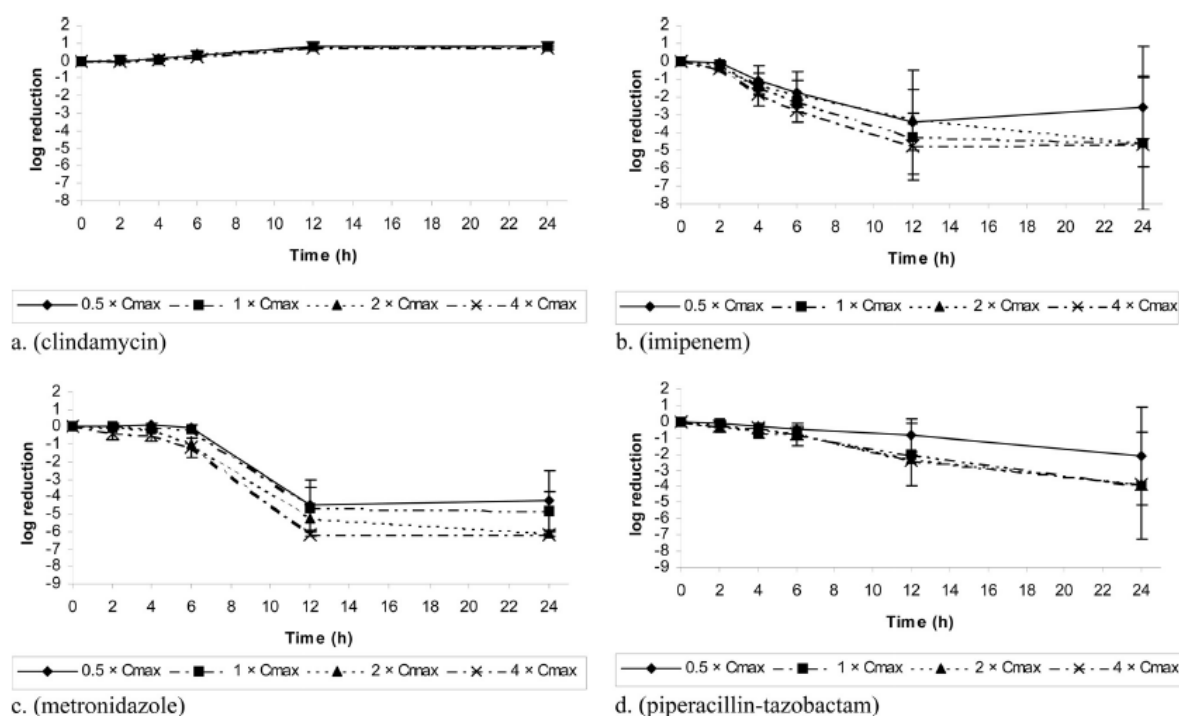


FIG 2 Pooled kill kinetic curves of 2 *B. fragilis* strains and clindamycin (a), 3 *B. fragilis* strains and imipenem (b), 2 *B. fragilis* strains and metronidazole (c), and 4 *B. fragilis* strains and piperacillin-tazobactam (d) for strains with MICs of ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$.

bactam. However, no statistical differences in killing rates could be found even between $0.5 \times C_{\text{max}}$ and $4 \times C_{\text{max}}$.

Comparing the prior established MICs by Etest with the assessed kill kinetics, a good correlation could be found when the organisms were susceptible to the respective antibiotic agent. Furthermore, in the present study imipenem showed a slightly better effect than did piperacillin-tazobactam. In contrast, clinical trials comparing piperacillin-tazobactam with imipenem/cilastatin in patients with intra-abdominal infections revealed equal efficacy (5, 18) or slight advantages for piperacillin-tazobactam (4). Against resistant strains, clindamycin showed no effect on those strains while metronidazole could show a rather good effect. Thus, metronidazole appeared to be the most effective investigated substance but still needs to be combined with another antibiotic to cover infections with aerobic bacteria in mixed infections.

In summary, the kill kinetics over time could provide additional information on local resistance patterns, which is of utmost importance for an adequate prophylaxis and treatment in anaerobic or mixed infections. Kill kinetics assays should be performed in studies after establishing MIC values and also choosing resistant strains.

REFERENCES

- Betriu C, et al. 2008. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2686–2690.
- Boselli E, et al. 2003. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of cefepime administered in continuous infusion in critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. *Crit. Care Med.* 31:2102–2106.
- Brazier JS, Stubbs SL, Duerden BI. 1999. Metronidazole resistance among clinical isolates belonging to the *Bacteroides fragilis* group: time to be concerned? *J. Antimicrob. Chemother.* 44:580–581.
- Eklund AE, Nord CE, Swedish Study Group. 1993. A randomized multicenter trial of piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of severe intra-abdominal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 31(Suppl. A):79–85.
- Erasmus AA, et al. 2004. Randomized comparison of piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of patients with intra-abdominal infection. *Asian J. Surg.* 27:227–235.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2012. EUCAST clinical breakpoint table v.2.0, valid from 2012-01-01. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Basel, Switzerland. <http://www.eucast.org>.
- Fille M, Mango M, Lechner M, Schaumann R. 2006. *Bacteroides fragilis* group: trends in resistance. *Curr. Microbiol.* 52:153–157.
- Flaherty JF, et al. 1988. Comparative pharmacokinetics and serum inhibitory activity of clindamycin in different dosing regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1825–1829.
- Golan Y, et al. 2003. Emergence of fluoroquinolone resistance among *Bacteroides* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:208–213.
- Hedberg M, Nord CE. 2003. ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 36:475–488.
- Houghton GW, Thorne PS, Smith J, Templeton R, Collier J. 1979. Comparison of the pharmacokinetics of metronidazole in healthy female volunteers following either a single oral or intravenous dose. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 8:337–341.
- Jhee SS, Kern JW, Burm JP, Yellin AE, Gill MA. 1995. Piperacillin-tazobactam pharmacokinetics in patients with intraabdominal infections. *Pharmacotherapy* 15:472–478.
- Karjagin J, Pahlke R, Karki T, Starkopf J. 2005. Distribution of metronidazole in muscle tissue of patients with septic shock and its efficacy against *Bacteroides fragilis* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:341–346.
- Kinzig M, Sörgel F, Brismar B, Nord CE. 1992. Pharmacokinetics and

- tissue penetration of tazobactam and piperacillin in patients undergoing colorectal surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1997–2004.
15. Männistö P, et al. 1984. Concentrations of metronidazole and tinidazole in female reproductive organs after a single intravenous infusion and after repeated oral administration. *Infection* 12:197–201.
 16. Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:369–377.
 17. Nagy E, Urbán E, Nord CE, ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:371–379.
 18. Niinikoski J, et al. 1993. Piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of intra-abdominal infections. *Surg. Gynecol. Obstet.* 176:255–261.
 19. Occhipinti DJ, et al. 1997. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of two multiple-dose piperacillin-tazobactam regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2511–2517.
 20. Olsen I, Solberg CO, Finegold SM. 1999. A primer on anaerobic bacteria and anaerobic infections for the uninitiated. *Infection* 27:159–165.
 21. Oteo J, Aracil B, Alós JI, Gómez-Garcés JL. 2000. High prevalence of resistance to clindamycin in *Bacteroides fragilis* group isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:691–693.
 22. Paradis D, et al. 1992. Comparative study of pharmacokinetics and serum bactericidal activities of cefpirome, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2085–2092.
 23. Schaumann R, Ackermann G, Pless B, Claros MC, Rodloff AC. 1999. In vitro activities of gatifloxacin, two other quinolones, and five nonquinolone antimicrobials against obligately anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2783–2786.
 24. Schaumann R, et al. 2000. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against obligately anaerobic bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16:225–232.
 25. Schaumann R, Petzold S, Fille M, Rodloff AC. 2005. Inducible metronidazole resistance in nim-positive and nim-negative *Bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing Columbia agar plates. *Infection* 33:368–372.
 26. Snyderman DR, et al. 2002. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends for 1997–2000. *Clin. Infect. Dis.* 35(Suppl. 1):S126–S134.
 27. Stratton CW, Weeks LW, Aldridge KE. 1987. Comparison of kill-kinetic studies with agar and broth microdilution methods for determination of antimicrobial activity of selected agents against members of the *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.* 25:645–649.
 28. Wexler HM. 2007. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:593–621.
 29. Zabinski RA, et al. 1993. Evaluation of activity of temafloxacin against *Bacteroides fragilis* by an *in vitro* pharmacodynamic system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2454–2458.

3. Zusammenfassung

Publikationspromotion zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Bestimmung der in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam gegenüber sensiblen und resistenten *Bacteroides fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik

eingereicht von: Matthias Funke

angefertigt an: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig

betreut von: PD Dr. med. habil. Reiner Schaumann

Mai 2014

B. fragilis ist bei anaeroben Mono- und aerob/anaeroben Mischinfektionen der am häufigsten nachgewiesene obligate Anaerobier. Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam sind Antibiotika, die in der Therapie von Infektionen mit Anaerobiern eingesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung dieser Antibiotika auf das Wachstum von 12 *B. fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik. Hierfür wurde für jeden Stamm und jedes Antibiotikum die MHK mittels E-Test bestimmt. Anhand der MHK-Werte wurden die *B. fragilis* Stämme in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst alle Stämme mit einer $\text{MHK} \leq 8 \mu\text{g/ml}$. In der zweiten Gruppe sind die Stämme mit einer $\text{MHK} > 8 \mu\text{g/ml}$ zusammengefasst.

Bei Clindamycin besteht durch die Trennung zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$ ein von den anderen Stämmen deutlich abgegrenztes Konglomerat mit 2 *B. fragilis* Stämme mit einer MHK von jeweils $\geq 32 \mu\text{g/ml}$.

Bei Imipenem werden die nach EUCAST sensiblen und intermediären Stämme zusammengefasst und von den resistenten Stämmen abgegrenzt.

Durch die Trennung zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$ entstehen bei Metronidazol 2 deutlich abgegrenzte Konglomerate von sensiblen beziehungsweise resistenten *B. fragilis* Stämmen.

Im Fall von Piperacillin erfolgte die Trennung ebenfalls zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$.

Ein nach EUCAST intermediär einzuordnender Stamm (MHK = $16 \mu\text{g/ml}$) bildet zusammen mit den resistenten Stämmen ein von den sensiblen Stämmen abgegrenztes Konglomerat.

Für die Erstellung der Absterbekinetiken wurden die einzelnen *B. fragilis* Stämme mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums über 24 Stunden inkubiert. Der Verlauf der Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) im Inokulum wurde durch die Entnahme von Proben zu den festgelegten Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden untersucht. Die jeweils verwendeten Konzentrationen betrugen für die Stämme mit einer $\text{MHK} \leq 8 \mu\text{g/ml}$ das 0,5fache, 1fache, 2fache und das 4fache der zuvor bestimmten MHK. In der zweiten Gruppe mit Stämmen, die eine $\text{MHK} > 8 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen, wurden das 0,5fache, 1fache, 2fache und das 4fache der maximal erreichbaren Plasmakonzentration (C_{max}) als Konzentration verwendet. Eine Versuchsreihe ohne Antibiotikum wurde jeweils als Wachstumskontrolle mitgeführt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der einfachen MHK-Bestimmung ist, dass anstelle einer Momentaufnahme ein zeitlicher Verlauf der Abtötung beziehungsweise des Wachstums dargestellt werden kann. Die Rate und das Ausmaß der Abtötung können somit bestimmt und verglichen werden. Weiterhin sind Aussagen über Effekte des Antibiotikums über- und unterhalb der MHK möglich. Somit können verschiedene Konzentrationen eines Antibiotikums miteinander verglichen werden. Zudem ist mittels Absterbekinetik auch ein Vergleich unterschiedlicher antibiotisch wirksamer Substanzen untereinander möglich (1, 2, 54, 94). Insbesondere bei den nach der MHK-Bestimmung als resistent einzuordnenden Mikroorganismen konnten deutliche Unterschiede gefunden werden.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigt Metronidazol die größte Aktivität gegenüber den getesteten *B. fragilis* Stämmen. In der Gruppe der sensiblen Stämme liegt die Konzentration von Metronidazol auch bei Verwendung der vierfachen MHK noch unter der maximal erreichbaren Konzentration im Blutplasma (C_{max}). Eine bakterizide Wirkung wird bei allen 10 sensiblen Stämmen erreicht, wenn Konzentrationen entsprechend der MHK oder darüber verwendet wurden. Dabei führen höhere Konzentrationen von Metronidazol nach 24 Stunden auch zu höheren Abtötungsraten. Subinhibitorische Konzentrationen von Metronidazol entsprechend der halben MHK führen zu einer Hemmung des Bakterienwachstums. In den Abbildungen 29, 30, 33 und 34 liegt die Wachstumskurve der mit der halben MHK behandelten Stämme deutlich unter der Wachstumskurve der jeweiligen unbehandelten

Stämme. Weiterhin konnte bei den beiden resistenten *B. fragilis* Stämmen bereits bei Verwendung der halben im menschlichen Blutplasma maximal erreichbaren Konzentration eine bakterizide Wirkung erzielt werden (Abb. 34 und 35 im Anhang). In einer Studie von Schaumann et al. 2004 erweist sich Metronidazol auch im Vergleich mit Fluorochinolonen als die aktivste Substanz (87). Angesichts der häufigen Mischinfektionen mit anaeroben und aeroben Keimen muss eine Therapie mit Metronidazol jedoch um ein im aeroben Bereich wirksames Antibiotikum ergänzt werden.

Imipenem und Piperacillin/Tazobactam zeigen eine ähnlich gute Wirksamkeit, die jedoch unterhalb der Wirksamkeit von Metronidazol liegt. Imipenem war geringfügig aktiver als Piperacillin/Tazobactam. Bei allen 9 gegenüber Imipenem sensiblen *B. fragilis* Stämmen lag die Konzentration der vierfachen MHK noch unter der maximal erreichbaren Plasmakonzentration. Auch bei den 8 gegenüber Piperacillin/Tazobactam sensiblen *B. fragilis* Stämmen lag die vierfache MHK unter der maximal erreichbaren Plasmakonzentration. Die Verwendung von subinhibitorischen Konzentrationen von $\frac{1}{2} \times \text{MHK}$ hatte bei beiden Substanzen kaum Einfluss auf das Bakterienwachstum. Bei Piperacillin/Tazobactam konnte im Gegensatz zu Metronidazol auch die Verwendung von Konzentrationen entsprechend $1 \times \text{MHK}$ im Durchschnitt keine größere Wirksamkeit erzielen als die Verwendung der halben MHK. Erst bei Verwendung der vierfachen MHK konnte durchschnittlich nach 24 Stunden bei beiden Substanzen ein bakterizider Effekt erreicht werden. Insgesamt konnte in der Gruppe der sensiblen *B. fragilis* Stämme Imipenem bei 8 von 9 Stämmen und Piperacillin/Tazobactam bei 6 von 8 Stämmen einen bakteriziden Effekt erreichen. In der Gruppe der resistenten *B. fragilis* Stämme führte die Verwendung der maximal erreichbaren Plasmakonzentration bei 2 der 3 gegenüber Imipenem resistenten Stämme zu einer effektiven Abtötung (Abb. 19 und 20 im Anhang). Bei dem 3. gegenüber Imipenem resistenten Stamm kommt es bis zum Zeitpunkt 12 Stunden zu einer Reduktion der Bakterienzahl und im Anschluss zu einem erneuten Wachstum (Abb. 13 im Anhang). Bei 3 der 4 gegenüber Piperacillin/Tazobactam resistenten Stämme wird ebenfalls eine effektive Abtötung erreicht (Abb. 41, 43 und 44 im Anhang). Der 4. gegenüber Piperacillin/Tazobactam resistente Stamm wird durch die einfache C_{\max} das Bakterienwachstum kaum beeinflusst (Abb. 37 im Anhang). Die Verwendung der halben im menschlichen Plasma maximal erreichbaren Konzentration ($\frac{1}{2} \times C_{\max}$) führt bei Imipenem nach 12 Stunden zu einer Reduktion der KBE um 2 bis 3 Logstufen, nach 24 Stunden jedoch wieder zu einem Anstieg der KBE. Im Fall von Piperacillin/Tazobactam führt die Verwendung von $\frac{1}{2} \times C_{\max}$ zu einer gleichförmigen Reduktion der Anzahl der KBE um etwa eine Logstufe nach 24 Stunden.

Sowohl Imipenem als auch Piperacillin/Tazobactam werden in der Therapie von Anaerobierinfektionen als Monotherapie eingesetzt. Die Datenlage ist bezüglich einer Überlegenheit einer der beiden Substanzen nicht ganz eindeutig. In einigen klinischen Studien sowie in einer sogenannten Monte Carlo-Simulation von Eagye et al. wird eine gute Wirksamkeit von Piperacillin/Tazobactam und Imipenem ohne statistisch signifikante Unterschiede beschrieben (17, 20, 63). In anderen Studien finden sich jedoch auch Hinweise für eine leichte Überlegenheit von Piperacillin/Tazobactam (19).

Clindamycin zeigte sich im Vergleich mit den getesteten Antibiotika am schwächsten wirksam. Nur bei 5 der 10 gegenüber Clindamycin sensiblen *B. fragilis* Stämmen konnte eine bakterizide Wirkung erreicht werden. Dabei weisen 2 Stämme eine MHK von 6 µg/ml, ein Stamm eine MHK von 2 µg/ml und 2 Stämme eine MHK von 0,03 µg/ml auf. Eine Korrelation von bakterizider Wirkung und MHK lässt sich innerhalb der Gruppe der gegenüber Clindamycin sensiblen Stämme nicht nachweisen. In der Gruppe der *B. fragilis* Stämme mit einer MHK > 8 µg/ml kann auch bei Verwendung der vierfachen C_{max} keine Hemmung des Bakterienwachstums durch Clindamycin festgestellt werden. Eine kalkulierte Gabe von Clindamycin kann aufgrund dieser Daten nicht mehr empfohlen werden. Auch in der Literatur finden sich Empfehlungen gegen den kalkulierten Einsatz von Clindamycin bei Infektionen mit Beteiligung von Anaerobiern. Vielmehr ist im Falle eines beabsichtigten Einsatzes von Clindamycin das Vorliegen einer Empfindlichkeitsbestimmung erforderlich (23, 77).

Viele Studien konnten bei Anaerobiern eine Zunahme von resistenten Erregern gegenüber häufig verwendeten Antibiotika zeigen. Insbesondere wurde dies innerhalb der wichtigen *B. fragilis* Gruppe beschrieben (4, 23, 32, 55, 59, 67, 78, 79, 88, 97). Eine Empfindlichkeitsbestimmung sollte daher auch für Anaerobier in der Routinediagnostik immer durchgeführt werden (23).

Zur kontinuierlichen Überwachung der Resistenzsituation insbesondere für die *B. fragilis* Gruppe sind neben der Resistenzbestimmung in der Routinediagnostik epidemiologische Studien notwendig. Nur so kann eine adäquate empirische Therapie bei Verdacht auf Infektionen mit Beteiligung von Anaerobiern erfolgen. Leider erlaubt die alleinige Bestimmung der MHK keinen Rückschluss auf die Geschwindigkeit und Ausmaß der bakteriziden Aktivität eines Antibiotikums. Unterschiedliche Konzentrationen einer antibiotisch wirksamen Substanz oberhalb der MHK können zu unterschiedlichen Absterberaten der Bakterien führen. Andererseits können auch subinhibitorische Konzentrationen unterhalb der MHK Einfluss auf das Bakterienwachstum haben (56). Ein

anderer Zugang zur Ermittlung der Wirksamkeit von Antibiotika sind Absterbekinetiken. Diese bilden das Wachstum beziehungsweise das Absterben von Bakterien über die Zeit ab und ermöglichen einen direkten Vergleich von verschiedenen Antibiotikaklassen und auch Antibiotikakonzentrationen untereinander. Detailliertere Informationen über den zeitlichen Verlauf der antibakteriellen Wirkung können so ermittelt werden (56, 100).

In der vorliegenden Studie konnte eine enge Korrelation von den erstellten Absterbekinetiken mit den ermittelten MHK-Werten belegt werden, wenn die Stämme gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum sensibel waren. Im Falle der resistenten Stämme konnten die Absterbekinetiken zusätzliche Informationen liefern. Um die Resistenzsituation möglichst genau zu beobachten, sollten Absterbekinetiken im Rahmen von Studien nach Bestimmung der MHK insbesondere von als resistent einzuordnenden Stämmen durchgeführt werden. So können wertvolle Informationen über die örtliche Resistenzsituation gewonnen werden. Deren genaue Kenntnis ist von größter Bedeutung bei Prophylaxe und Therapie von Anaerobierinfektionen.

4. Thesen zur Dissertationsschrift

1. Metronidazol ist die aktivste der 4 verwendeten Substanzen und ist zum Teil auch bei resistenten *B. fragilis* Stämmen wirksam.
2. Metronidazol muss bei anaeroben/aeroben Mischinfektionen mit Antibiotika kombiniert werden, die zusätzlich fakultative Anaerobier bzw. Aerobier erfassen.
3. Imipenem und Piperacillin/Tazobactam sind sowohl gegen Stämme mit einer $\text{MHK} \leq 8 \mu\text{g/ml}$ als auch gegen Stämme mit einer $\text{MHK} > 8 \mu\text{g/ml}$ aktiv.
4. Die Studienlage zur Überlegenheit einer der beiden Substanzen ist nicht eindeutig.
5. Clindamycin ist in der vorliegenden Arbeit am schwächsten wirksam. In der Gruppe der *B. fragilis* Stämme mit einer $\text{MHK} > 8 \mu\text{g/ml}$ ist keine Aktivität erkennbar.
6. Eine kalkulierte Therapie mit Clindamycin sollte deshalb bei Infektionen mit obligaten Anaerobiern nicht mehr empfohlen werden.
7. Die Therapieoptionen von Infektionen mit *B. fragilis* sind begrenzt.
8. Aufgrund steigender Resistenzraten ist eine genaue Kenntnis der lokalen Resistenzsituation zur Einleitung einer adäquaten kalkulierten Therapie von Infektionen durch obligate Anaerobier unabdingbar.

4. Literaturverzeichnis

1. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, Drusano GL. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. Clin Infect Dis. 2007;44:79-86. Epub 2006 Nov 27. Erratum in: Clin Infect Dis. 2007 Feb 15;44:624.
2. Baron EJ, Citron DM, Wexler HM. Son of anaerobic susceptibility testing – revisited. Clin Microbiol Newsl. 1990;12:69-72.
3. Balfour JA, Bryson HM, Brogden RN. Imipenem/cilastatin: an update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. Drugs. 1996;51:99-136.
4. Betriu C, Culebras E, Gómez M, López F, Rodríguez-Avial I, Picazo JJ. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period 1997 to 2006, in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52: 2686–2690.
5. Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with Etest. Clin Infect Dis. 1993;16(Suppl 4):367-370.
6. Boswell FJ, Andrews JM, Wise R. Pharmacodynamic properties of BAY 12-8039 on gram-positive and gram-negative organisms as demonstrated by studies of time-kill kinetics and postantibiotic effect. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Jun;41:1377-1379.
7. Brazier JS, Stubbs SL, Duerden BI. Metronidazole resistance among clinical isolates belonging to the *Bacteroides fragilis* group: time to be concerned? J Antimicrob Chemother 1999;44:580–581.
8. Bryan LE, Kowand SK, Van Den Elzen HM. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1979;15:7-13.
9. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJC. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 1991;29:2197-2203.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI methodes for antimicrobial testing of anaerobic bacteria, 7th ed. Approved standard M11-A7. 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
11. Craig WA, Ebert SC. Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. Scand J Infect Dis Suppl. 1990;74:63-70.

12. Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection*. 2005;33(Suppl. 2):55-70.
13. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. Medizinische Mikrobiologie und Immunologie: Diagnostische Verfahren. Berlin, Wien, Zürich: Beuth Verlag, 2004.
14. Diniz CG, Santos SG, Pestana AC, Farias LM, Carvalho MA, Auxiliadora M. Chromosomal breakage in the *B. fragilis* group induced by metronidazole treatment. *Anaerobe* 2000;6:149–153.
15. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23:160-201.
16. Drusano GL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clin Infect Dis* 2007; 15(45 Suppl 1):89–95.
17. Eagye KJ, Kuti JL, Dowzicky M, Nicolau DP. Empiric therapy for secondary peritonitis: a pharmacodynamic analysis of cefepime, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, levofloxacin, piperacillin/tazobactam, and tigecycline using Monte Carlo simulation. *Clin Ther*. 2007;29:889-899.
18. Edwards DI. Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. II. Mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1993;31:201-210.
19. Eklund AE, Nord CE and Swedish Study Group. 1993. A randomized multicenter trial of piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of severe intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother*. 1993;31 Suppl A:79-85.
20. Erasmo AA, Crisostomo AC, Yan LN, Hong YS, Lee KU, Lo CM. Randomized comparison of piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of patients with intra-abdominal infection. *Asian J Surg*. 2004;27:227-235.
21. Eron L. Imipenem/cilastatin therapy of bacteremia. *Am J Med*. 1985;78 Suppl 6A: 95–99.
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST clinical breakpoint table v. 2.0, valid from 2012-01-01. 2012. European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Basel, Switzerland. <http://www.eucast.org>.
23. Fille M, Mango M, Lechner M, Schaumann R. *Bacteroides fragilis* group: trends in resistance. *Curr Microbiol*. 2006;52:153-157.
24. Finegold, SM. Laboratory diagnosis of anaerobic infections. *Mt Sinai J Med*. 1976;43:776-794.
25. Finegold SM. Anaerobic bacteria in human disease. New York, San Francisco, London: Academic Press, 1977.

26. Finegold SM. Anaerobic infections in humans: an overview. *Anaerobe*. 1995;1:3-9.
27. Giamarellou H. Anaerobic infection therapy. *Int. J Antimicrob Agents* 2000;16:341-346.
28. Goldstein EJC. Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 1996;23(Suppl. 1):97-101.
29. Goldstein EJC. Intra-abdominal anaerobic infections: bacteriology and therapeutic potential of newer antimicrobial carbapenem, fluoroquinolone, and desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis*. 2002;35(Suppl. 1):106-111.
30. Gorbach SL. Antibiotic treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 1994;18(Suppl. 4):305-310.
31. Gutmann L, Kitzis MD, Yamabe S, Acar JF. Comparative evaluation of a new beta-lactamase inhibitor, YTR 830, combined with different beta-lactam antibiotics against bacteria harboring known beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;29:955-957.
32. Hedberg M, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:475-488.
33. Hellinger WC, Brewer NS. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc*. 1999;74:420-434.
34. Higashitani F, Hyodo A, Ishida N, Inoue M, Mitsuhashi S. Inhibition of beta-lactamases by tazobactam and in-vitro antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. *J Antimicrob Chemother*. 1990;25:567-574.
35. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth-KTL anaerobic bacterial manual. Belmont, California: Star Publishing Company, 2002.
36. Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG, Birnbaum J. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J Antimicrob Chemother*. 1983;12 (Suppl D):1-35.
37. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Aug;52:145-148. Epub 2003 Jul 1.
38. Kelly MJ. The quantitative and histological demonstration of pathogenic synergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in guinea-pig wounds. *J Med Microbiol*. 1978;11:513-523.
39. Klastersky JA. Use of imipenem as empirical treatment of febrile neutropenia. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21:393-402.

40. Knorr M. Über die fusospirilläre Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillum sputigetum*. (Zugleich ein Beitrag über die Bakteriologie der Mundhöhle.) II. Mitteilung. Die Gattung *Fusobacterium*. Centralbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. 1922;89:4-22.
41. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med. 2006;34:1589-1596.
42. Land KM, Johnson PJ. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. Drug Resist Updat. 1999;2:289–294.
43. Leiros HK, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. J Biol Chem 2004;279:55840–55849.
44. Li T, Wang Q, Chen F, Li X, Luo S, Fang H, Wang D, Li Z, Hou X, Wang H. Biochemical characteristics of new delhi metallo- β -lactamase-1 show unexpected difference to other MBLs. PLoS One. 2013;8(4):e61914.
45. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001;47:247-50.
46. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis. 2010;50 (Suppl 1):16-23.
47. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and nim genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1253–1256.
48. Loesche WJ. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. Appl Microbiol. 1969;18:723-727.
49. Lubbe MM, Stanley K, Chalkley LJ. Prevalence of nim genes in anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa. FEMS Microbiol Lett. 1999;172:79-83.
50. McDermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. Int J Toxicol. 2003;22(2):135-143.
51. McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Am J Health Syst Pharm. 1997;54:1420-1433.
52. Menninger JR. Mechanism of inhibition of protein synthesis by macrolide and lincosamide antibiotics. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 1995;6:229-250.

53. Meyer, RD, Finegold, SM. Anaerobic infections: diagnosis and treatment. South Med J. 1976;69:1178-1195.
54. Moloughney JG, D Thomas J, Toney JH. Novel IMP-1 metallo-beta-lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1. FEMS Microbiol Lett. 2005;243:65-71.
55. Moore WE and Holdeman LV. Some newer concepts of the human intestinal flora. Am J Med Technol. 1975;41:427-430.
56. Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:369-377.
57. Nagy E, Urbán E, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin. Microbiol. Infect. 2011;7:371-379.
58. Nathens AB, Rotstein OD. Antimicrobial therapy for intraabdominal infection. Am J Surg. 1996;172(suppl 6A):1-6.
59. Neu HC. Clinical perspectives on imipenem. J Antimicrob Chemother. 1983;12(Suppl D):149-153.
60. Neu HC. Overview of mechanisms of bacterial resistance. Diagn Microbiol Infect Dis. 1989;12(4 Suppl):109-116.
61. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L, Snyderman DR. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. Clin Infect Dis. 2000;30:870-876.
62. Nichols RL, Smith JW. Wound and intraabdominal infections: microbiological considerations and approaches to treatment. Clin Infect Dis. 1993;16:266-272.
63. Nichols RL, Smith JW. Anaerobes from a surgical perspective. Clin Infect Dis. 1994;18(Suppl. 4):280-286.
64. Nicolau DP. Predicting antibacterial response from pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles. Infection. 2001;29(Suppl. 2):11-15.
65. Niinikoski J, Havia T, Alhava E, Pääkkönen M, Miettinen P, Kivilaakso E, Haapiainen R, Matikainen M, Laitinen S. 1993. Piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of intra-abdominal infections. Surg Gynecol Obstet. 176:255-261.
66. Olsen I, Solberg CO, Finegold SM. A primer on anaerobic bacteria and anaerobic infections for the uninitiated. Infection. 1999;27:159-165.

67. Olsson-Liljequist B, Nord CE. Methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis. 1994;18:293-296.
68. Onderdonk AB, Bartlett JG, Louie T, Sullivan-Seigler N, Gorbach SL. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. Infect Immun. 1976;13:22-26.
69. Oteo J, Aracil B, Alós JI, Gómez-Garcés JL. High prevalence of resistance to clindamycin in *Bacteroides fragilis* group isolates. J Antimicrob Chemother. 2000;45:691-693.
70. Perry CM, Markham A. Piperacillin/tazobactam: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. Drugs. 1999;57:805-843.
71. Peterson ML, Hovde LB, Wright DH, Brown GH, Hoang AD, Rotschafer JC. Pharmacodynamics of trovafloxacin and levofloxacin against *Bacteroides fragilis* in an in vitro pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:203-210.
72. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in anaerobes. Clin. Infect Dis. 1997;24(Suppl. 1):110-120.
73. Reyssset G. Genetics of 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* species. Anaerobe. 1996;2:59-69.
74. Rodloff A, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. Dtsch Arztebl Int. 2008;105:657-662. Epub 2008 Sep 26.
75. Rodloff AC, Becker J, Blanchard DK, Klein TW, Hahn H, Friedmann H. Inhibition of macrophage phagocytosis by *Bacteroides fragilis* in vivo and in vitro. Adv Exp Med Biol. 1990;256:593-601.
76. Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. Two decades of imipenem therapy. J Antimicrob Chemother. 2006;58:916-929. Epub 2006 Sep 22.
77. Rodloff AC, Hillinger F, Friedmann H, Hahn H. Effects of anti-*Bacteroides*-antibodies on *Escherichia coli* and different *Bacteroides* species in vitro and vivo. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]. 1986;262:483-491.
78. Rodloff AC, Schaumann R. Nicht sporenbildende obligat anaerobe Bakterien. In: Mittermayer H, Allerberger F, Hrsg. Spektrum der Infektionskrankheiten – Diagnostik, Verlauf und zeitgemäße Therapie; Werk in 2 Bänden. Balingen: Spitta Verlag GmbH & Co. KG, 2006:529-540.
79. Rodloff AC, Widera P, Ehlers S, Montag T, Lucas M, Schmidt G, Hahn H. Suppression of blastogenic transformation of lymphocytes by *Bacteroides fragilis* in vitro and in vivo. Zentralbl Bakteriell. 1990;274:406-416.

80. Rogers MB, Parker AC, Smith CJ. Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37:2391-2400.
81. Salonen JH, Eerola E, Meurman O. Clinical significance and outcome of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1413-1417.
82. Schaumann R. In vitro und in vivo Untersuchungen zur Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber obligaten Anaerobiern in Mono- und aerob/anaeroben Mischkulturen. Habilitation; Leipzig, 2008.
83. Schaumann R, Ackermann G, Pless B, Claros MC, Goldstein EJ, Rodloff AC. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against obligately anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:225-232.
84. Schaumann R, Ackermann G, Pless B, Claros MC, Rodloff AC. In vitro activities of gatifloxacin, two other quinolones, and five nonquinolone antimicrobials against obligately anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2783-2786.
85. Schaumann R, Goldstein EJ, Forberg J, Rodloff AC. Activity of moxifloxacin against *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model employing pure and mixed cultures. *J Med Microbiol.* 2005;54:749-753.
86. Schaumann R, Petzold S, Fille M, Rodloff AC. Inducible metronidazole resistance in nim-positive and nim-negative *bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing columbia agar plates. *Infection.* 2005;33:368-372.
87. Schaumann R, Rabenhorst E, Funke M, Rodloff A. Activity of moxifloxacin against 12 selected clinical *B. fragilis* strains compared with seven other agents investigated by time-kill kinetics. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(Suppl. 3):438.
88. Schaumann R, Rodloff AC. Activities of quinolones against obligately anaerobic bacteria. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* 2007;6:49-56.
89. Schaumann R, Rodloff AC. Diagnostik, Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung von obligaten Anaerobiern. *Chemotherapie J.* 2007;16:75-87.
90. Schaumann R, Schäfer V, Mauch H, Wacha H, Schöffel U, Rodloff AC. MiQ 32: Intraabdominelle Infektionen unter besonderer Berücksichtigung der Peritonitis. Elsevier GmbH, München: Urban & Fischer Verlag. 2012.
91. Schoonover LL, Occhipinti DJ, Rodvold KA, Danziger LH. Piperacillin/tazobactam: a new beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Ann Pharmacother.* 1995;29:501-514.

92. Seidel C. In vitro Aktivität von vier ausgewählten Antibiotika gegenüber *Bacteroides fragilis* Stämmen: Absterbekinetik und pharmakokinetisch/pharmakodynamische Untersuchungen. Dissertation; Leipzig, 2008.
93. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Goldstein EJC, Finegold SM, Harrell LJ, Hecht DW, Jenkins SG, Pierson C, Venezia R, Rihs J, Gorbach SL. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* Group: report and analysis of trends for 1997-2000. Clin Infect Dis. 2002;5(Suppl. 1):126-134.
94. Solomkin JS, Mazuski JE, Baron EJ, Sawyer RG, Nathens AB, DiPiro JT, Buchman T, Dellinger EP, Jernigan J, Gorbach S, Chow AW, Bartlett J; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the selection of anti-infective agents for complicated intra-abdominal infections. Clin Infect Dis. 2003 Oct 15;37:997-1005. Epub 2003 Sep 25.
95. Spangler SK, Jacobs MR, Appelbaum PC. Time-kill study of the activity of trovafloxacin compared with ciprofloxacin, sparfloxacin, metronidazole, cefoxitin, piperacillin and piperacillin/tazobactam against six anaerobes. J Antimicrob Chemother. 1997;39(Suppl B):23-27.
96. Spížek J, Novotná J, Rezanka T. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. Adv Appl Microbiol. 2004;56:121-154.
97. Stearne LE, Kooi C, Goessens WH, Bakker-Woudenberg IA, Gyssens IC. In vitro activity of trovafloxacin against *Bacteroides fragilis* in mixed culture with either *Escherichia coli* or a vancomycin-resistant strain of *Enterococcus faecium* determined by an anaerobic time-kill technique. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(1):243-251.
98. Stille, W. Antibiotikatherapie. 11. Auflage, Stuttgart, New York: Schattauer. 2005.
99. Stratton CW. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. J Med Liban. 2000;48:186-198.
100. Stratton CW, Weeks LW, Aldridge KE. Comparison of kill-kinetic studies with agar and broth microdilution methods for determination of antimicrobial activity of selected agents against members of the *Bacteroides fragilis* group. J Clin Microbiol. 1987;25:645-649.
101. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. J Mol Biol. 2003;330:1005-1014.

102. Theron MM, Janse Van Rensburg MN, Chalkley LJ. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.). J Antimicrob Chemother 2004;54:240–242.
103. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):593-621.
104. Williams RJ, Yang YJ, Livermore DM. Mechanisms by which imipenem may overcome resistance in gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother. 1986;18(Suppl E):9-13.
105. Wise R. A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents. Can Respir J. 1999;6(Suppl A):20-22.
106. Wittmann DH. Intraabdominelle Infektionen. Analysieren und gezielt behandeln: Hoechst Monographie „Aktuelles Wissen Hoechst“ Reihe Antibiotika; 1986.
107. Zabinski RA, Vance-Bryan K, Krinke AJ, Walker KJ, Moody JA, Rotschafer JC. Evaluation of activity of temafloxacin against *Bacteroides fragilis* by an in vitro pharmacodynamic system. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37:2454-2458.

5. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Arne C. Rodloff, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig, für die jederzeit gewährte Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Reiner Schaumann für die freundliche Überlassung des Themas und die umfassende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und ganz besonders für die hilfreichen Hinweise und das kritische Gegenlesen des Manuskriptes.

Ich danke den Mitarbeitern des Institutes, besonders Frau Daniela Adler und Frau Birgit Löffler, sowie meiner Kollegin Eva Janssen.

Dr. Ing. J. Forberg vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Universität Leipzig danke ich für die Beratung zu der statistischen Auswertung.

Mein Dank gilt auch meiner Frau Anja Funke und meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und das Verständnis.

6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Matthias Funke
Geburtsdatum	30.06.1980
Geburtsort	Halle/Saale
Anschrift	Gartenstraße 11 99974 Mühlhausen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1987-1991	Polytechnische Oberschule „Käthe Kollwitz“ Dingelstädt
1991-1999	St. Josef Gymnasium Dingelstädt
August 1999 – Juli 2000	Zivildienst Krankenhaus Reifenstein
01.10.2000 – 19.04.2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
16.02.2004 – 30.06.2004	Auslandssemester an Medizinischen Universität Gdansk in Danzig, Polen
am 10.05.2007	Approbation als Arzt
am 01.08.2007	Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin
01.08.2007 – 31.07.2009	Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin Kreiskrankenhaus Delitzsch GmbH
01.08.2009 – 31.01.2010	Assistenzarzt in der Gemeinschaftspraxis Dres. Med. Panse/Knauer, FÄ für Kinderheilkunde, Leipzig
01.02.2010 – 31.01.2011	Assistenzarzt in der internistischen Gemeinschaftspraxis Dres. Med. Taupitz/Schletter, Bad Düben
01.02.2011 – 31.07.2012	Assistenzarzt in der Praxis Dipl. med. E-M. Funke, Dingelstädt (Thüringen)
01.08.2012 – 07.10.2012	ohne ärztliche Tätigkeit
am 06.10.2012	Facharztanerkennung für Allgemeinmedizin
08.10.2012 – 31.12.2012	Entlastungsassistent in der Praxis Dipl. med. E-M. Funke, Dingelstädt (Thüringen)
seit 01.01.2013	Gemeinschaftspraxis mit Frau Dipl. med. E-M. Funke, Dingelstädt (Thüringen)

Publikationen:

Schaumann R, Janssen E, **Funke M**, Stîngu CS, Genzel GH, Janssen M, Rodloff AC. In vitro activities of levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and garenoxacin against *Bacteroides fragilis* strains evaluated by kill kinetics. J Med Microbiol. 2013; 62:576-581. Epub 2013 Jan 14.

Schaumann R, **Funke M**, Janssen E, Rodloff AC. In Vitro Activities of clindamycin, imipenem, metronidazole, and piperacillin-tazobactam against Susceptible and Resistant Isolates of *Bacteroides fragilis* Evaluated by Kill Kinetics. Antimicrob. Agents Chemother. 2012;56:3413-3416.

Schaumann R, Rabenhorst E, **Funke M**, Rodloff A: Activity of moxifloxacin against 12 selected clinical *B. fragilis* strains compared with seven other agents investigated by time-kill kinetics. Clin. Microbiol Infect. 2004;10(Suppl. 3):438.

8. Anhang

Tab. 1. Verteilung der MHK-Werte ($\mu\text{g/ml}$) für 12 *B. fragilis*-Stämme

Antibiotikum	Anzahl der Stämme mit einer MHK ($\mu\text{g/ml}$) von:										
	≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	≥ 32
Clindamycin	2					1	3	2	2		2
Imipenem			2	4	3						3
Metronidazol				1	6	3					2
Piperacillin/Tazobactam			1		1	2	2	2		1	3

Die Trennung zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$ teilt die *B. fragilis*-Stämme in 2 Gruppen: Wildtyp und resistente Stämme.

Nach EUCAST gelten folgende breakpoints (22):

B. fragilis Stämme und Clindamycin: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ (sensibel) und $> 4 \mu\text{g/ml}$ (resistent).

B. fragilis Stämme und Imipenem: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ (sensibel) und $> 8 \mu\text{g/ml}$ (resistent).

B. fragilis Stämme und Metronidazol: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ (sensibel) und $> 4 \mu\text{g/ml}$ (resistent).

B. fragilis Stämme und Piperacillin/Tazobactam: $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ (sensibel) und $> 16 \mu\text{g/ml}$ (resistent).

Bei Clindamycin erfolgte die Trennung ebenfalls zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$. 2 *B. fragilis* Stämme mit $\text{MHK} \geq 32$ bilden ein von den anderen Stämmen deutlich abgegrenztes Konglomerat.

Bei Imipenem werden sensible und intermediäre Stämme zusammengefasst und von resistenten Stämmen abgegrenzt.

Bei Metronidazol werden durch die Trennung zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$ 2 deutlich abgegrenzte Konglomerate getrennt, jeweils sensibel oder resistent.

Im Fall von Piperacillin erfolgte die Trennung ebenfalls zwischen $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ und $> 8 \mu\text{g/ml}$. Ein nach EUCAST intermediär einzuordnender Stamm ($\text{MHK} = 16 \mu\text{g/ml}$) bildet zusammen mit den resistenten Stämmen ein von den sensiblen Stämmen abgegrenztes Konglomerat.

Tab. 2. Herkunft der verwendeten *B. fragilis*-Stämme

Stammnummer:	Isolation aus:
RMA 0309	Abdomen
RMA 5081	Blut
RMA 5120	Appendix
RMA 5138	Blut
RMA 5691	Wundabstrich
RMA 5798	Wundabstrich
RMA 5935	Blut
RMA 6600	Abdomen
RMA 6791	Blut
WAL R 13054	Klinisches Isolat unbekannter Herkunft
WAL R 13174	Klinisches Isolat unbekannter Herkunft
WAL R 13267	Klinisches Isolat unbekannter Herkunft

Die Stämme mit der Bezeichnung RMA wurden freundlicherweise von E. J. C. Goldstein, R. M. Alden Research Laboratory, Santa Monica, California, USA, zur Verfügung gestellt.

Alle mit WAL R bezeichneten *B. fragilis* Stämme stammen aus klinischen internationalen Anaerobier-Studien.

Abbildungen 1 bis 12: Absterbekinetik-Untersuchungen zu Clindamycin

Abbildungen 13 bis 24: Absterbekinetik-Untersuchungen zu Imipenem

Abbildungen 25 bis 36: Absterbekinetik-Untersuchungen zu Metronidazol

Abbildungen 37 bis 48: Absterbekinetik-Untersuchungen zu Piperacillin/Tazobactam

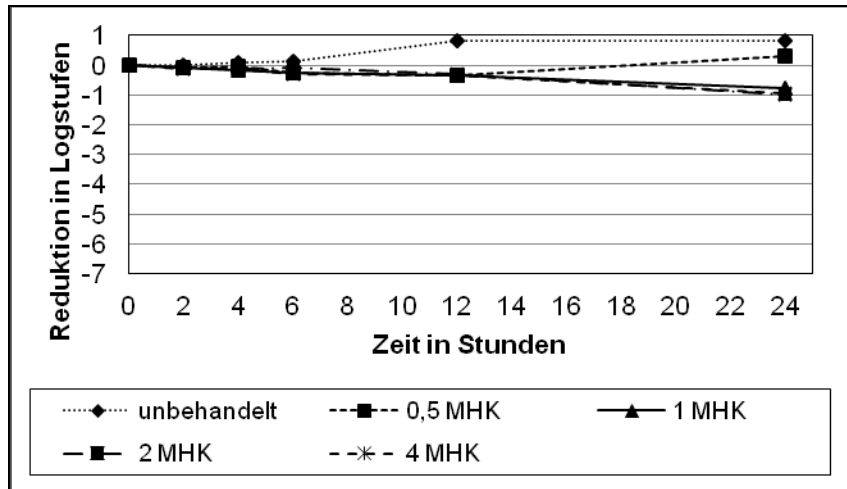


Abb. 1. Absterbekinetik von *B. fragilis* 0309 und Clindamycin

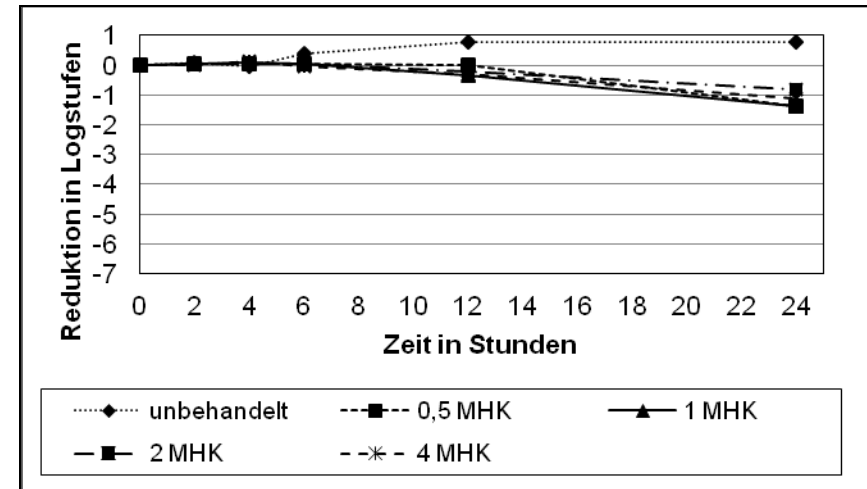


Abb. 2. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5081 und Clindamycin

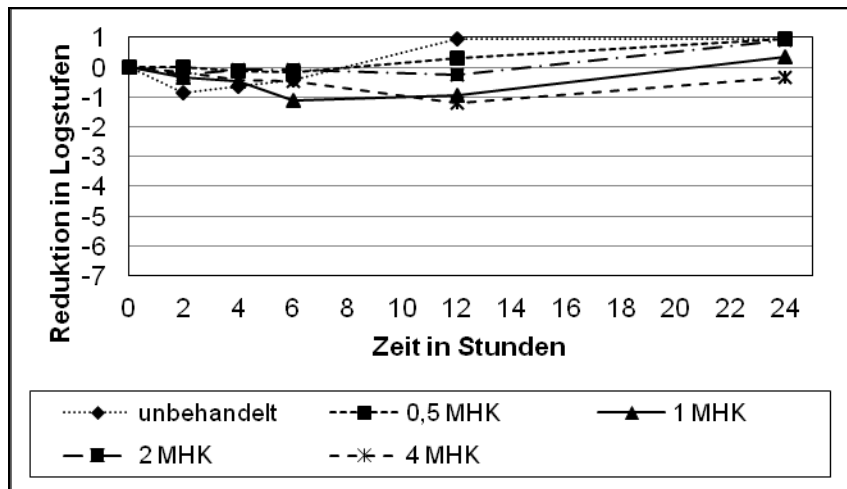


Abb. 3. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5120 und Clindamycin

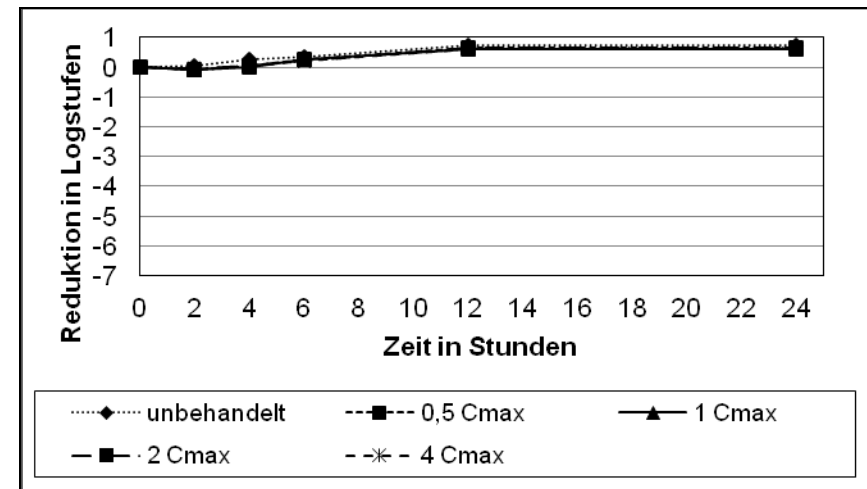


Abb. 4. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5138 und Clindamycin

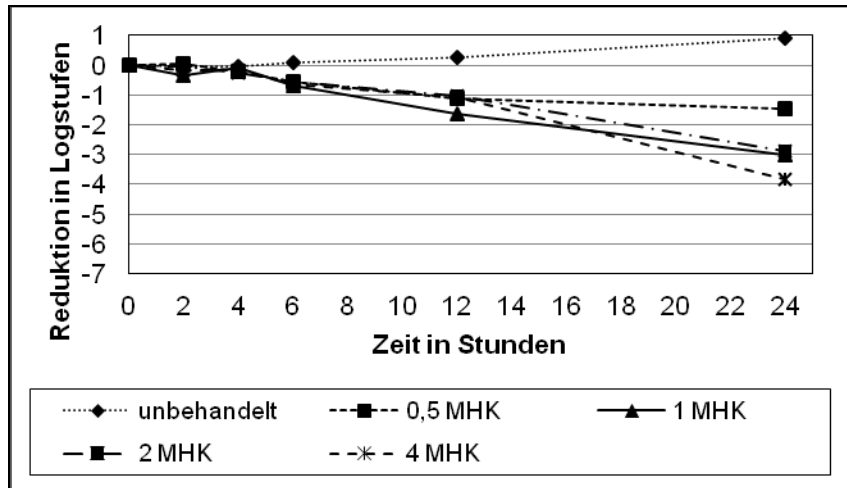


Abb. 5. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5691 und Clindamycin

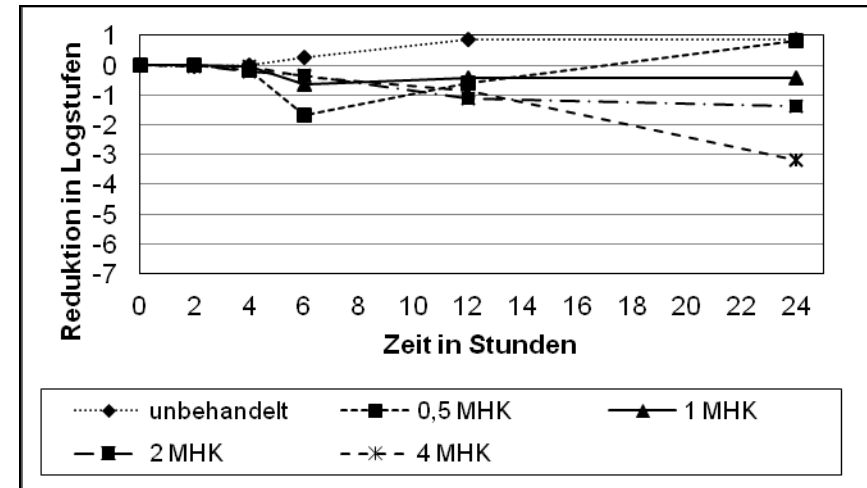


Abb. 6. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5798 und Clindamycin

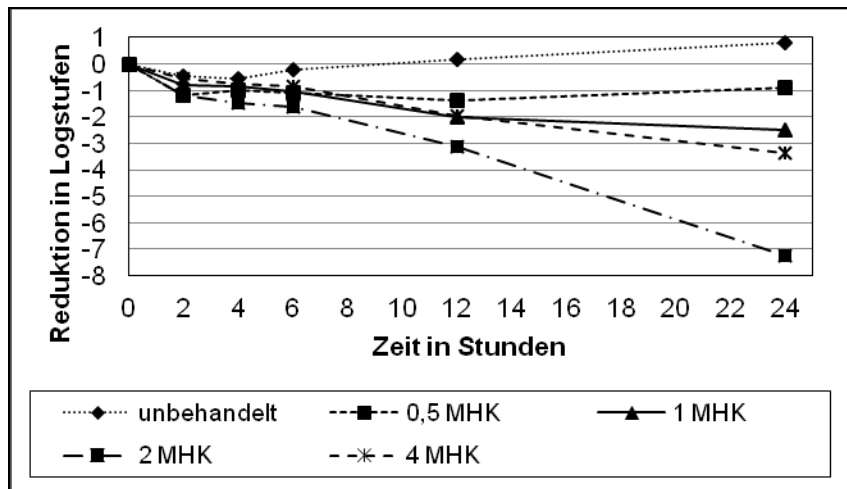


Abb. 7. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5935 und Clindamycin

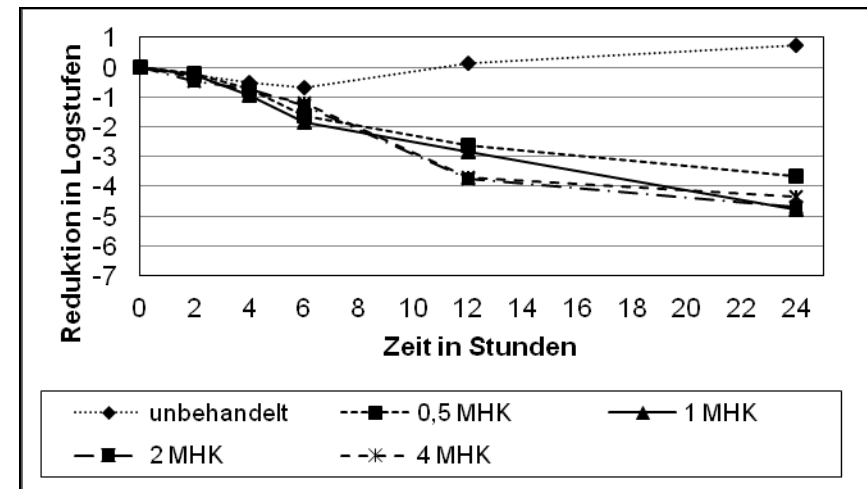


Abb. 8. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6600 und Clindamycin

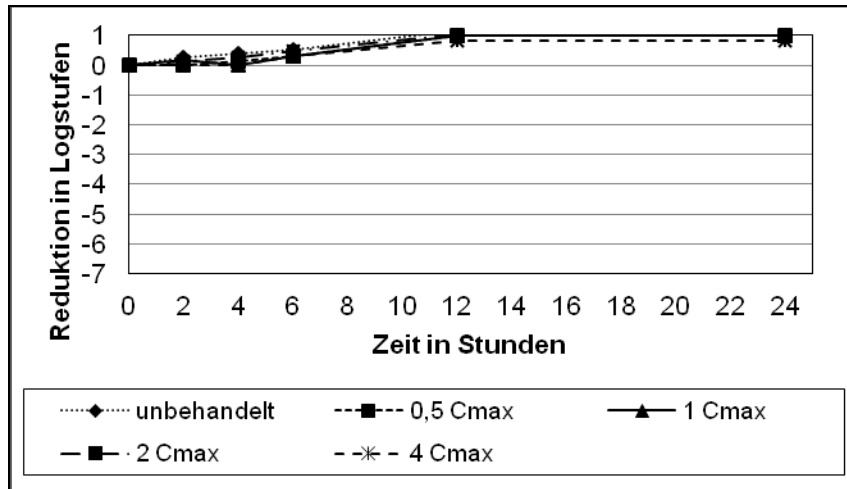


Abb. 9. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6791 und Clindamycin

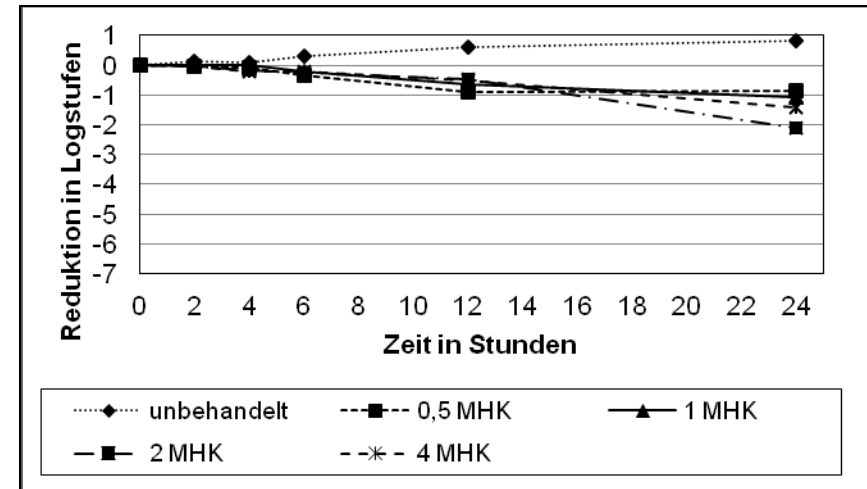


Abb. 10. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13054 und Clindamycin

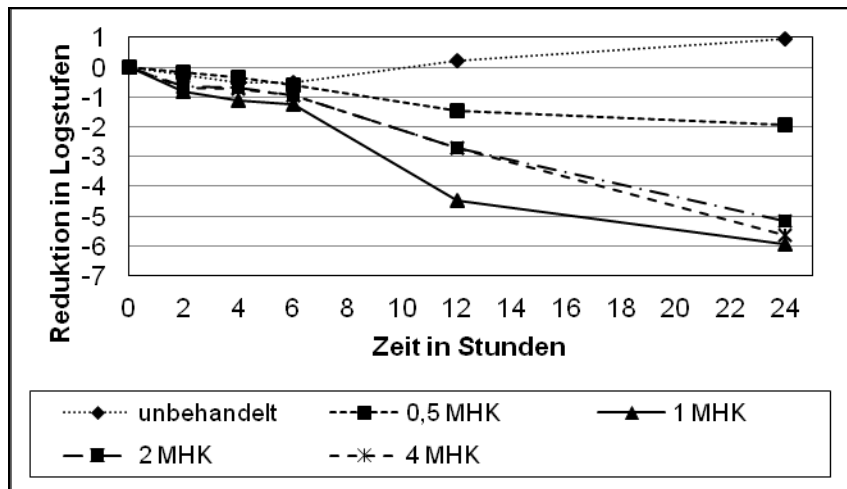


Abb. 11. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13174 und Clindamycin

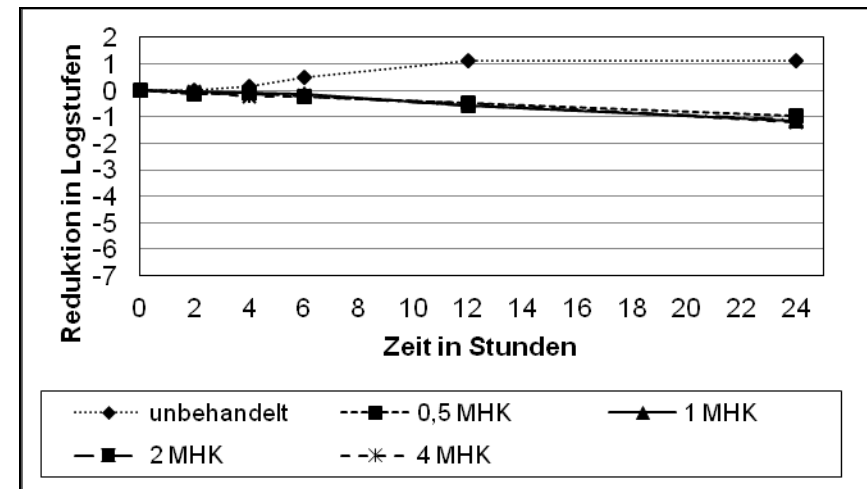


Abb. 12. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13267 und Clindamycin

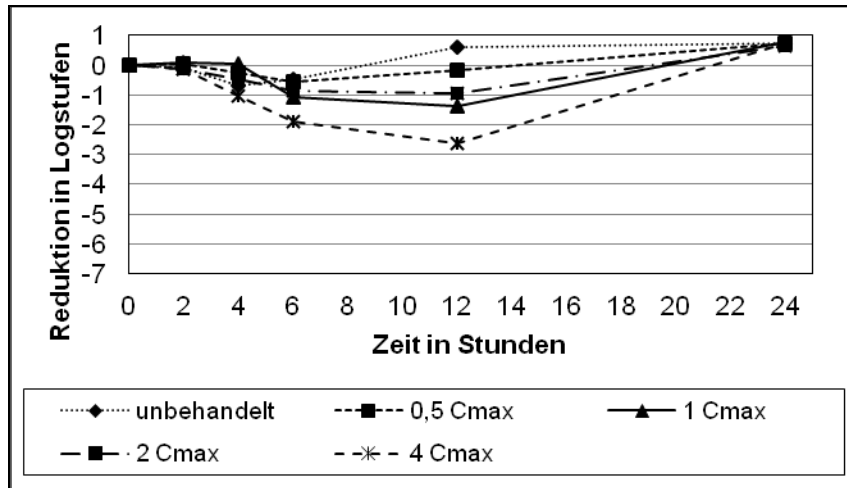


Abb. 13. Absterbekinetik von *B. fragilis* 0309 und Imipenem

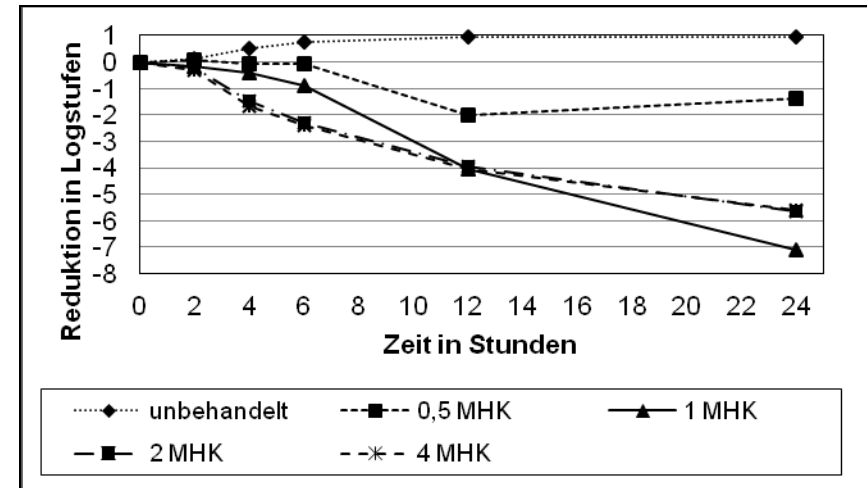


Abb. 14. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5081 und Imipenem

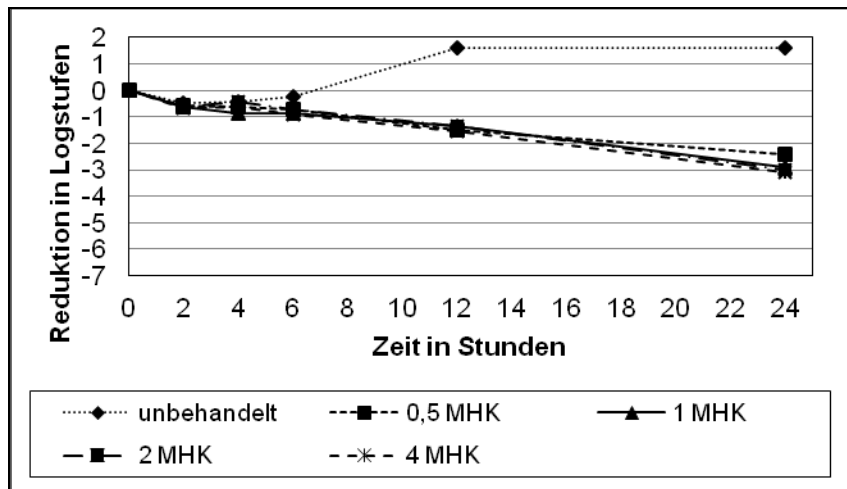


Abb. 15. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5120 und Imipenem

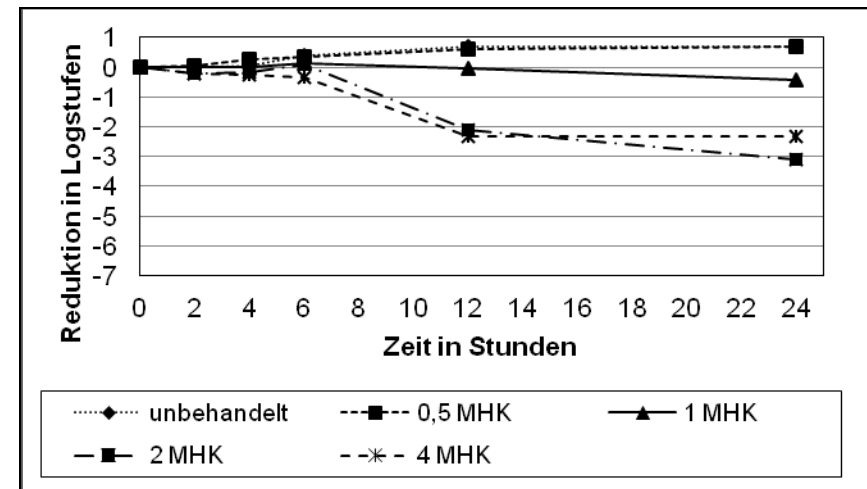
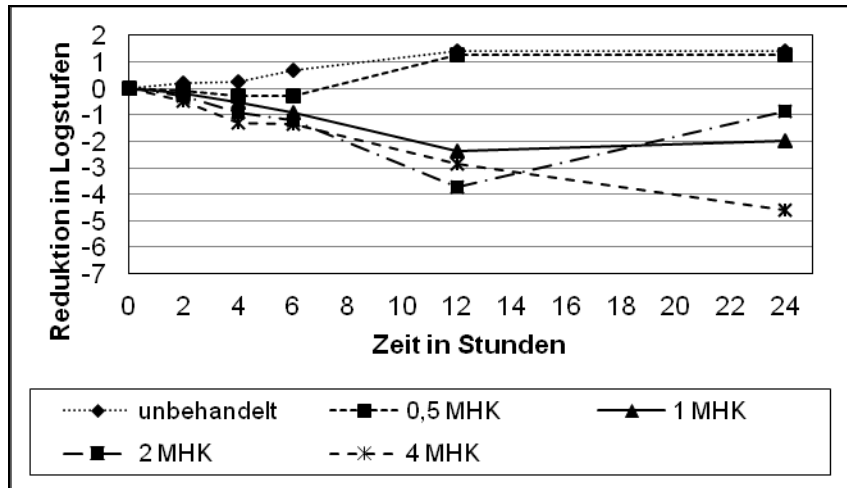
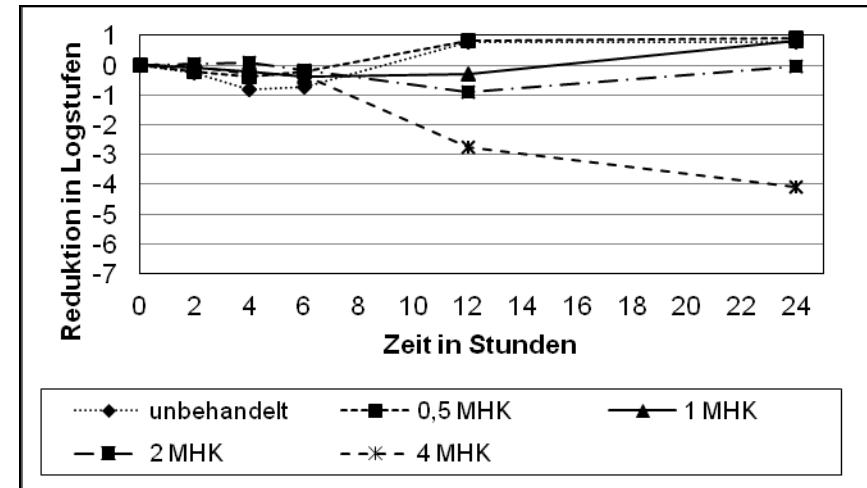
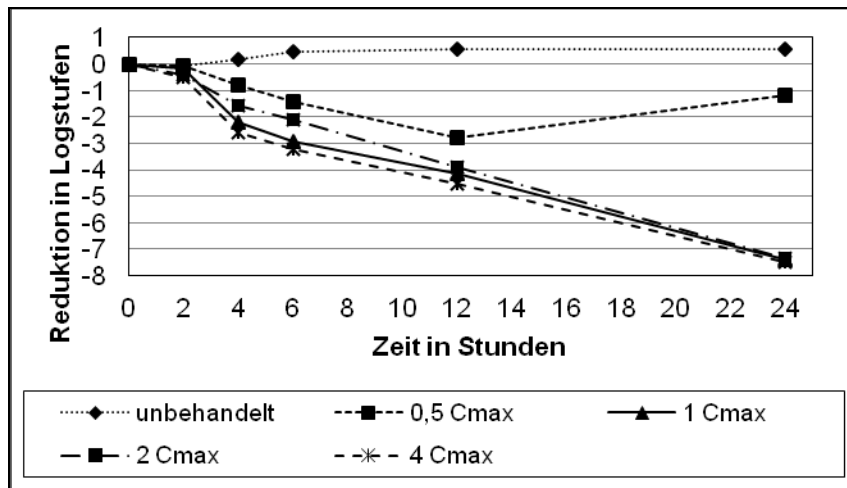
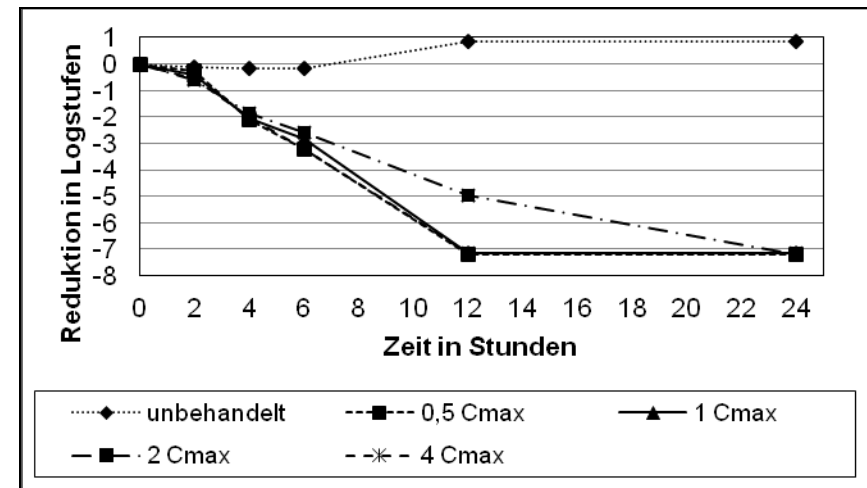
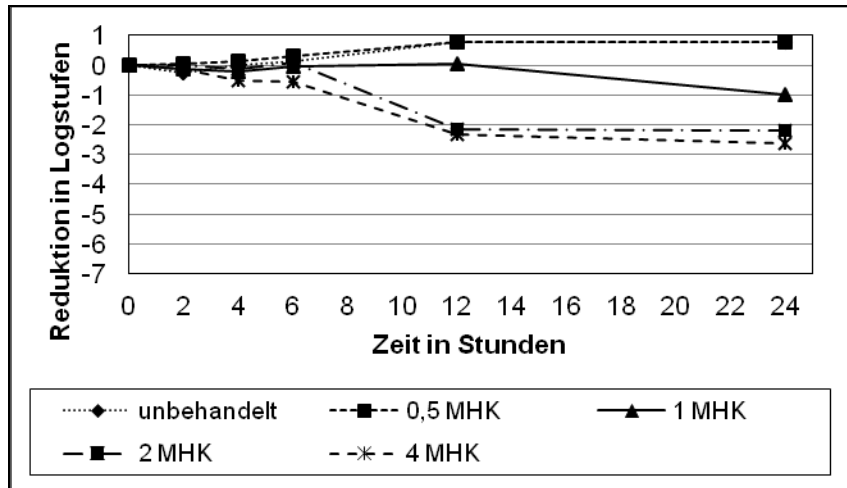
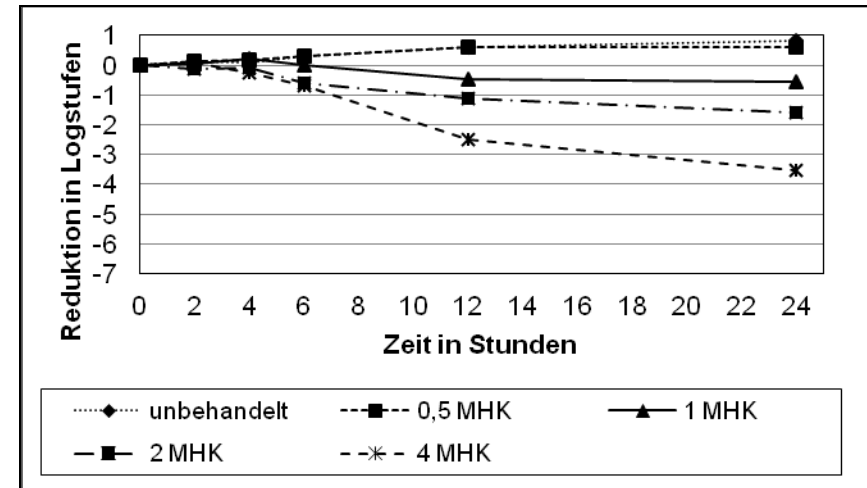
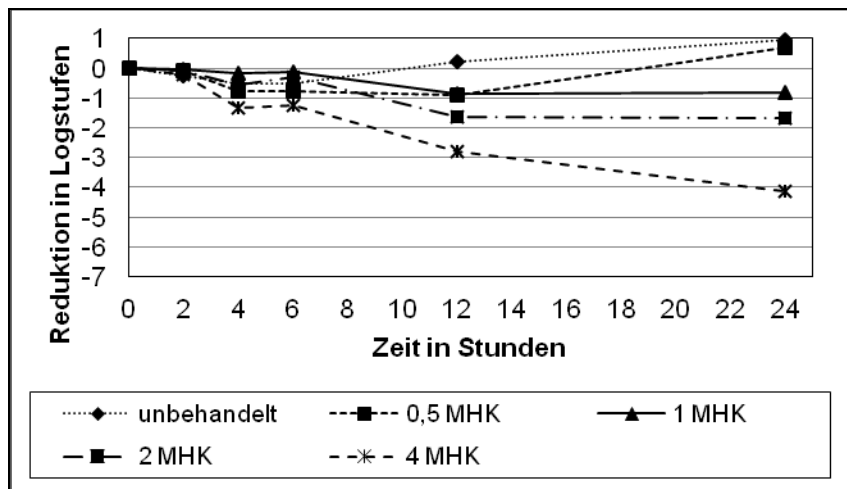
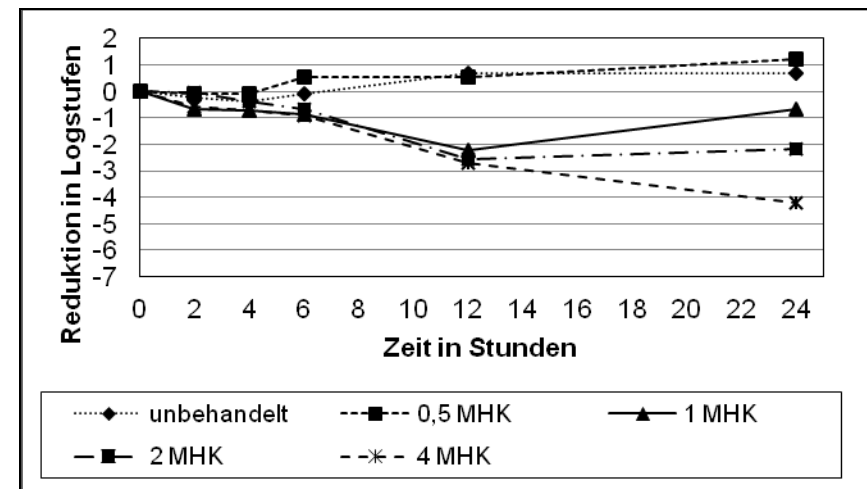
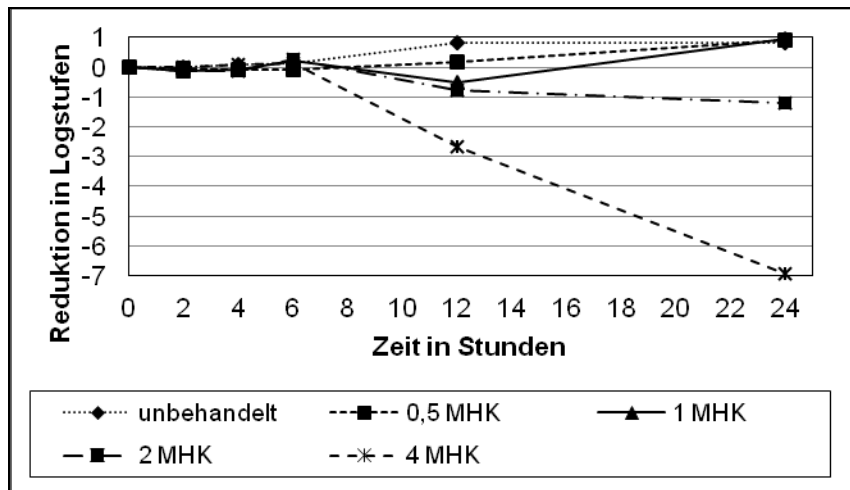
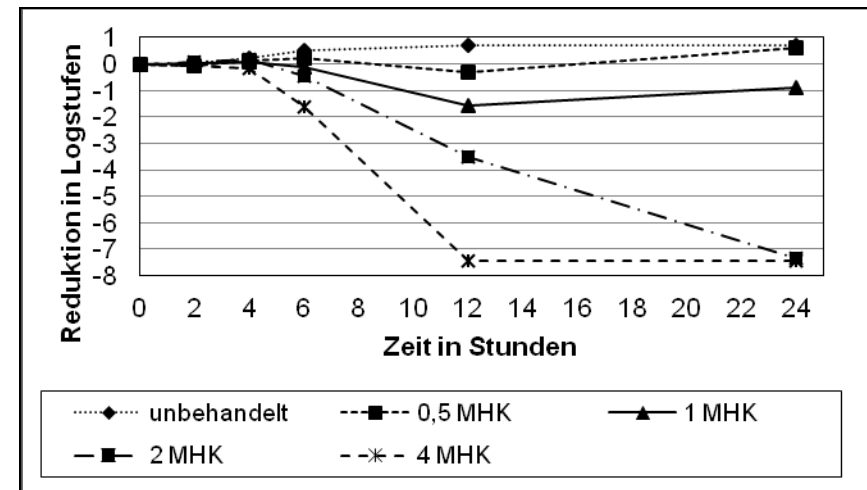
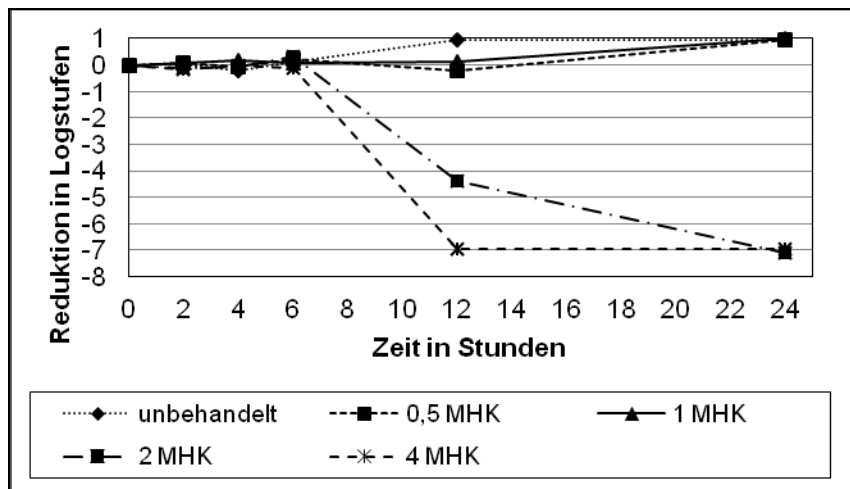
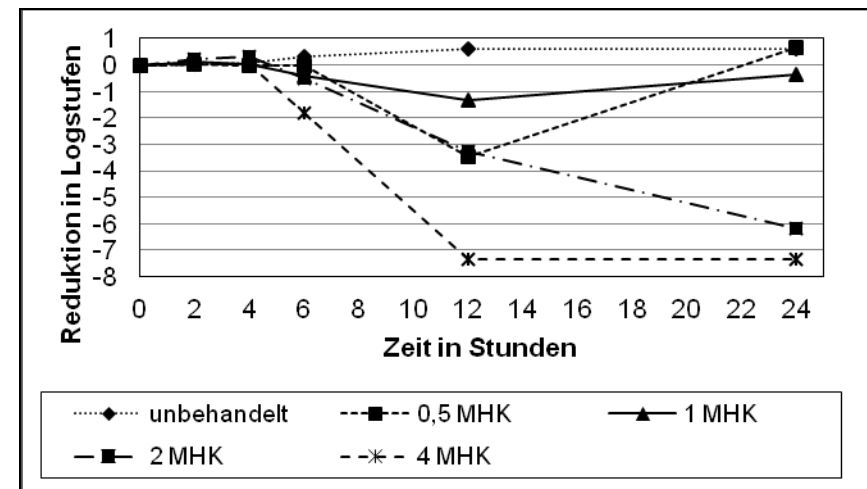
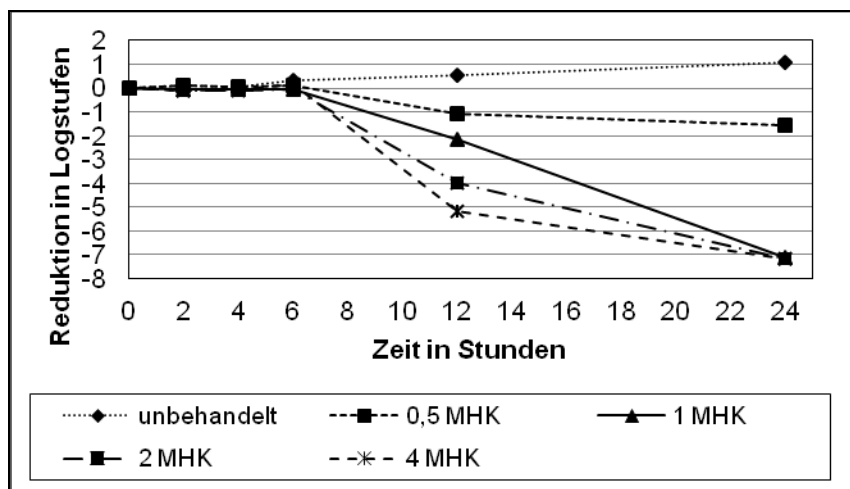
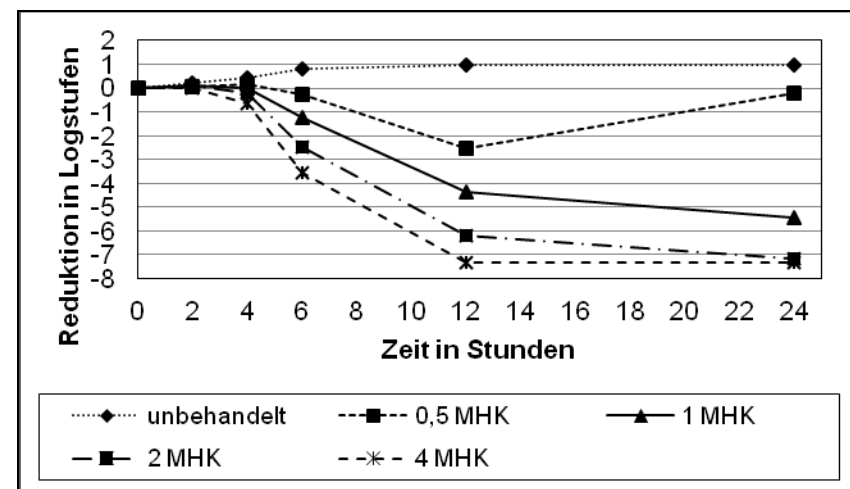
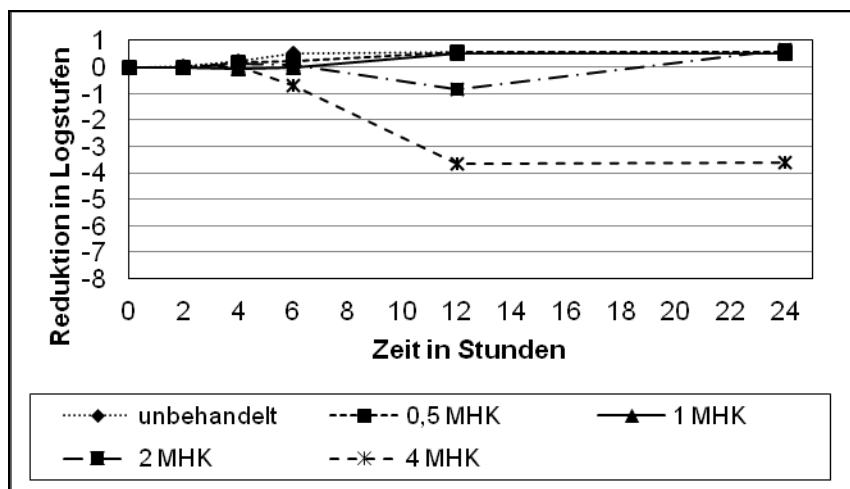
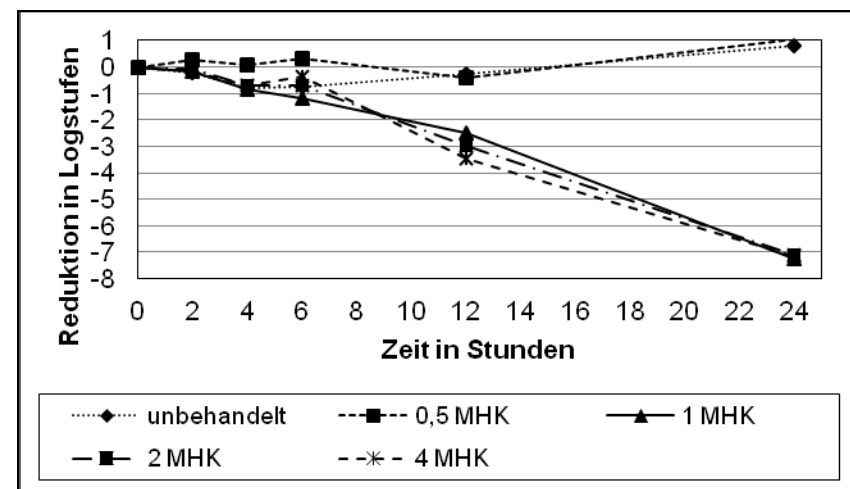


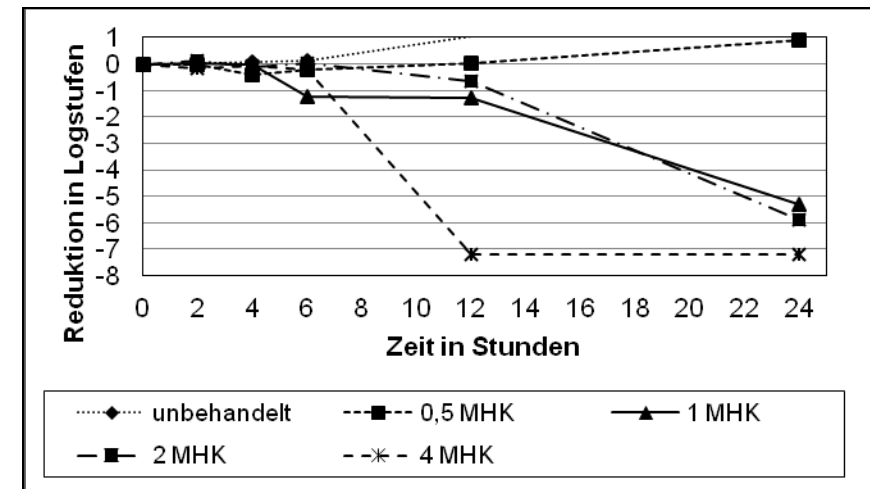
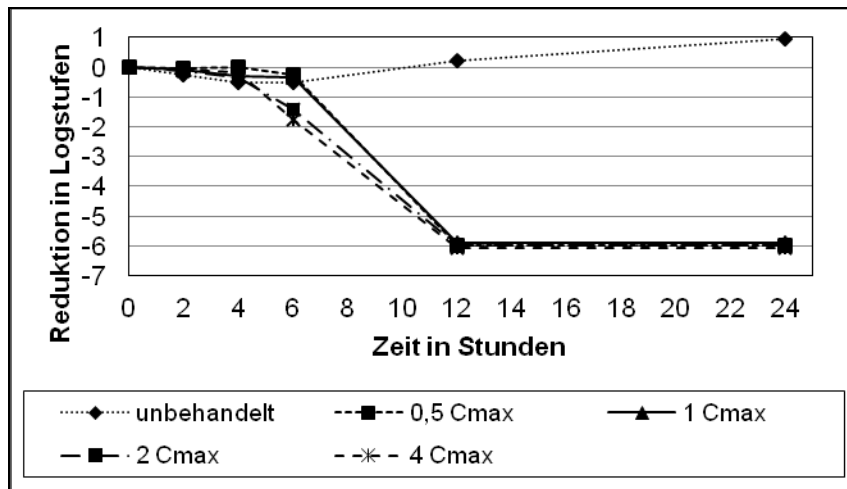
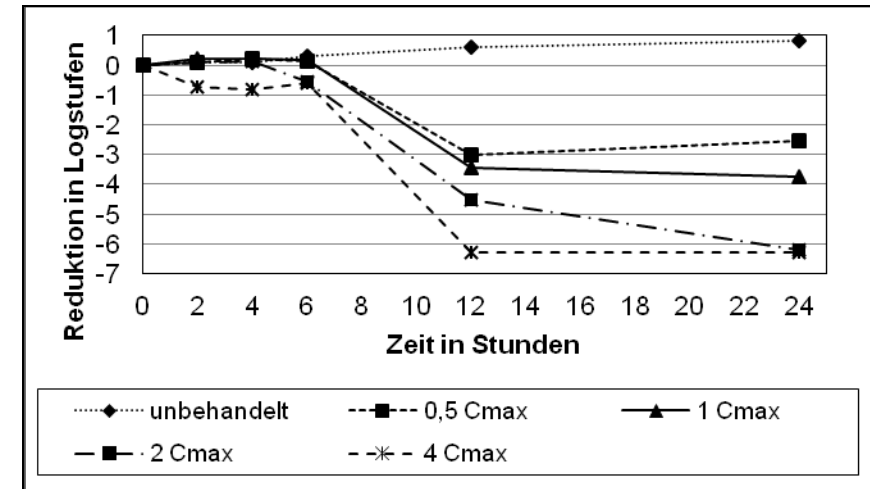
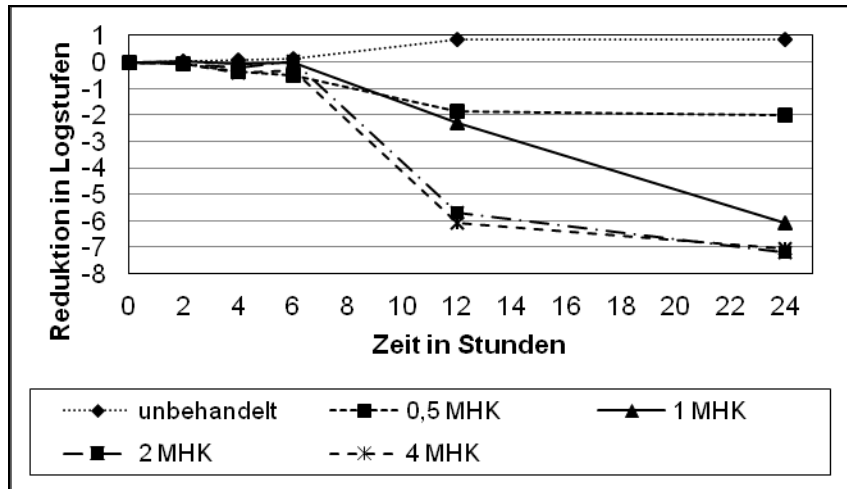
Abb. 16. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5138 und Imipenem

Abb. 17. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5691 und ImipenemAbb. 18. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5798 und ImipenemAbb. 19. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5935 und ImipenemAbb. 20. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6600 und Imipenem

Abb. 21. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6791 und ImipenemAbb. 22. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13054 und ImipenemAbb. 23. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13174 und ImipenemAbb. 24. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13267 und Imipenem

Abb. 25. Absterbekinetik von *B. fragilis* 0309 und MetronidazolAbb. 26. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5081 und MetronidazolAbb. 27. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5120 und MetronidazolAbb. 28. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5138 und Metronidazol

Abb. 29. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5691 und MetronidazolAbb. 30. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5798 und MetronidazolAbb. 31. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5935 und MetronidazolAbb. 32. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6600 und Metronidazol



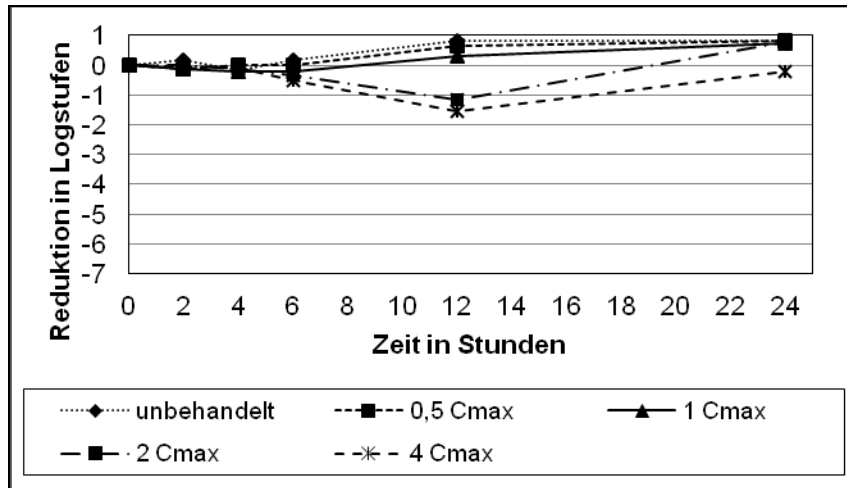


Abb. 37. Absterbekinetik von *B. fragilis* 0309 und Piperacillin/Tazobactam

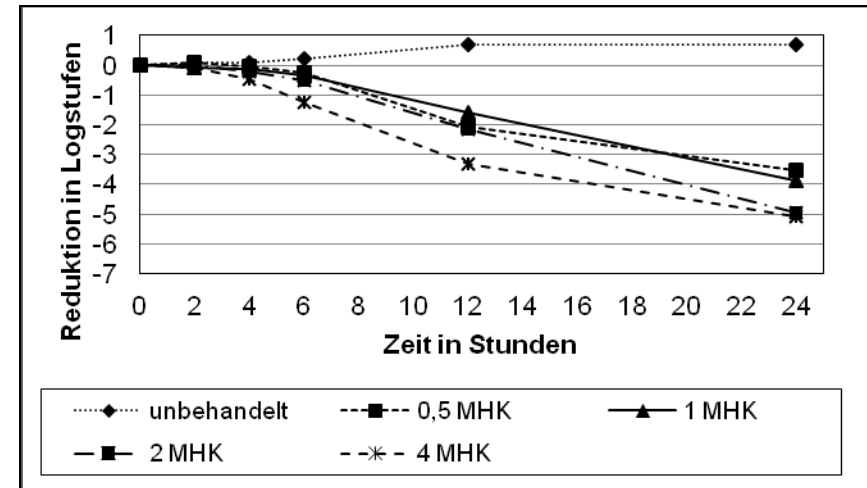


Abb. 38. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5081 und Piperacillin/Tazobactam

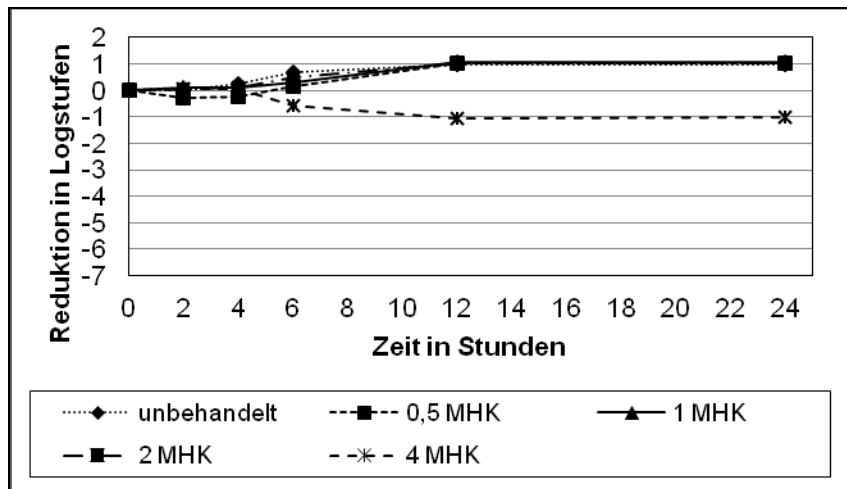


Abb. 39. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5120 und Piperacillin/Tazobactam

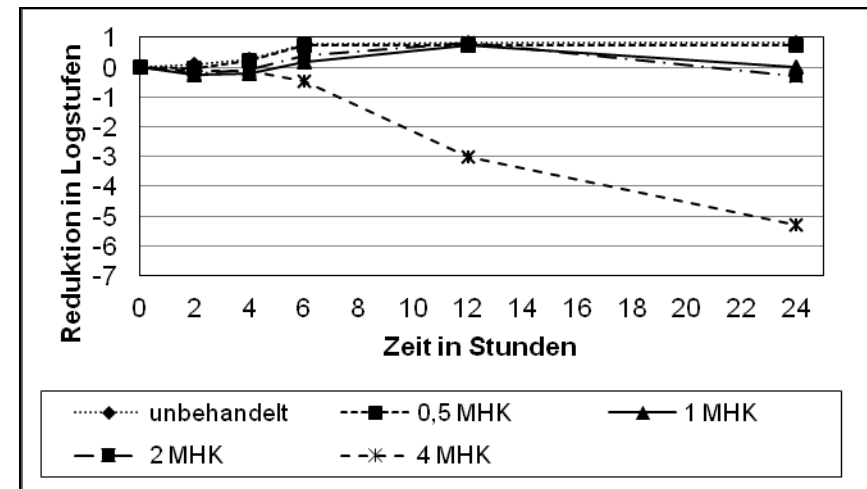


Abb. 40. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5138 und Piperacillin/Tazobactam

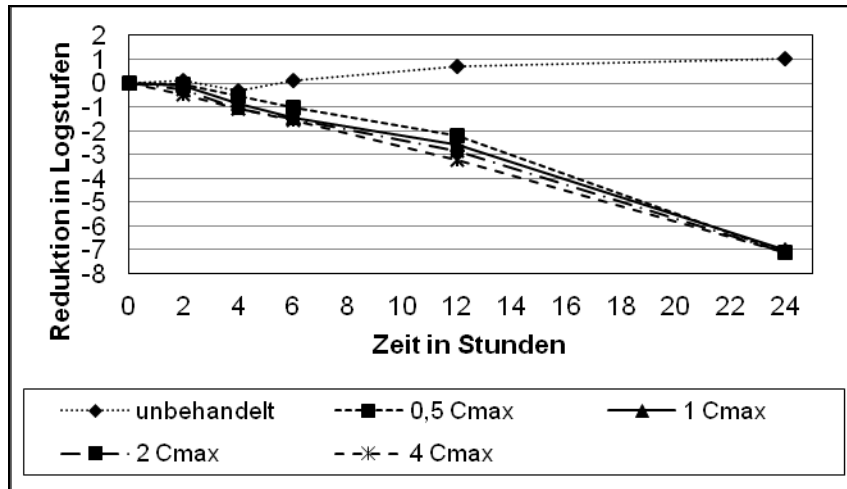


Abb. 41. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5691 und Piperacillin/Tazobactam

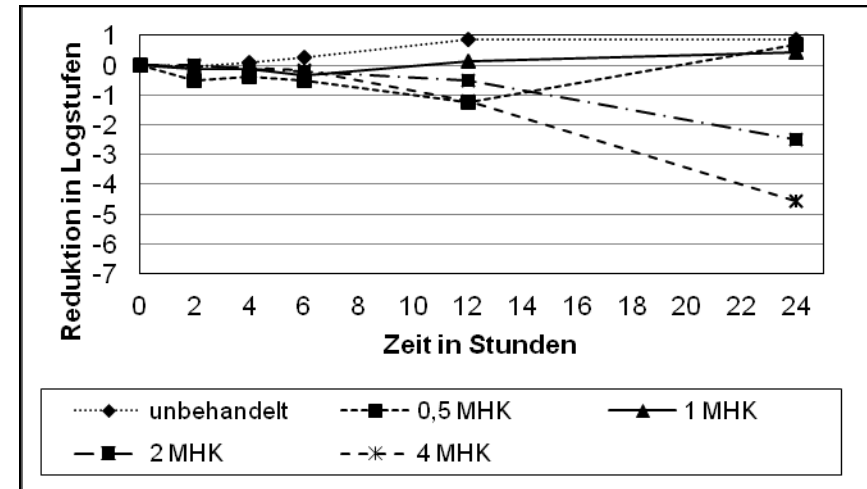


Abb. 42. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5798 und Piperacillin/Tazobactam

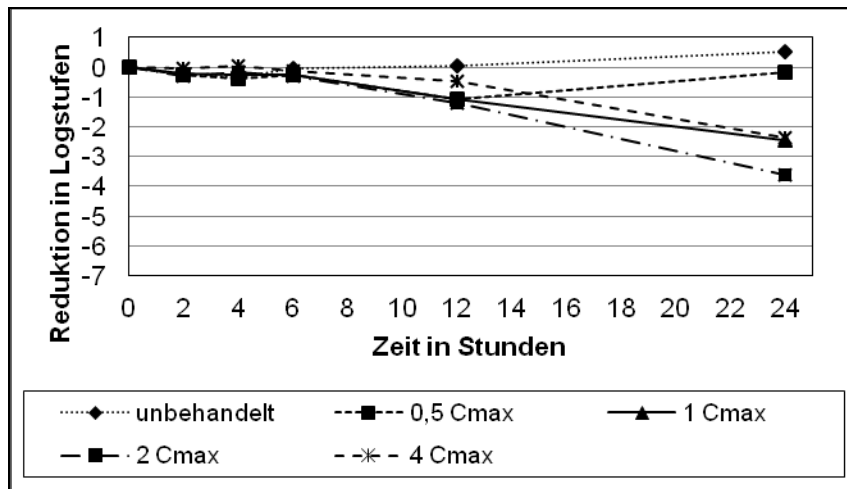


Abb. 43. Absterbekinetik von *B. fragilis* 5935 und Piperacillin/Tazobactam

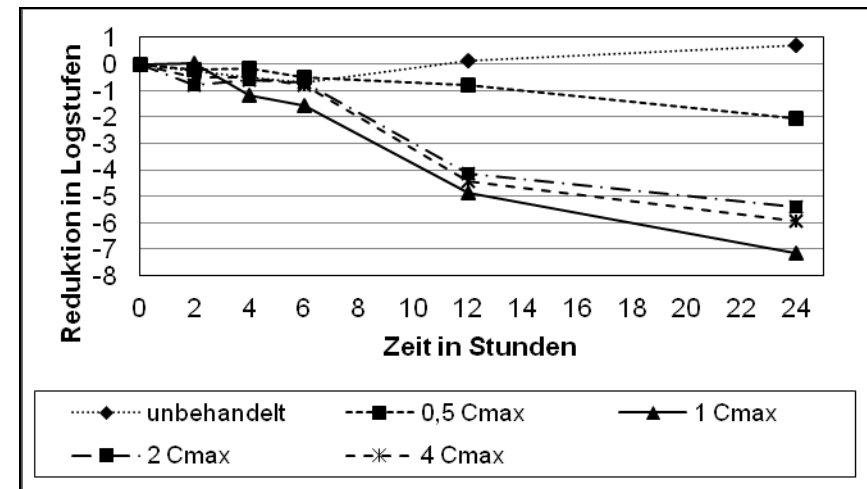


Abb. 44. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6600 und Piperacillin/Tazobactam

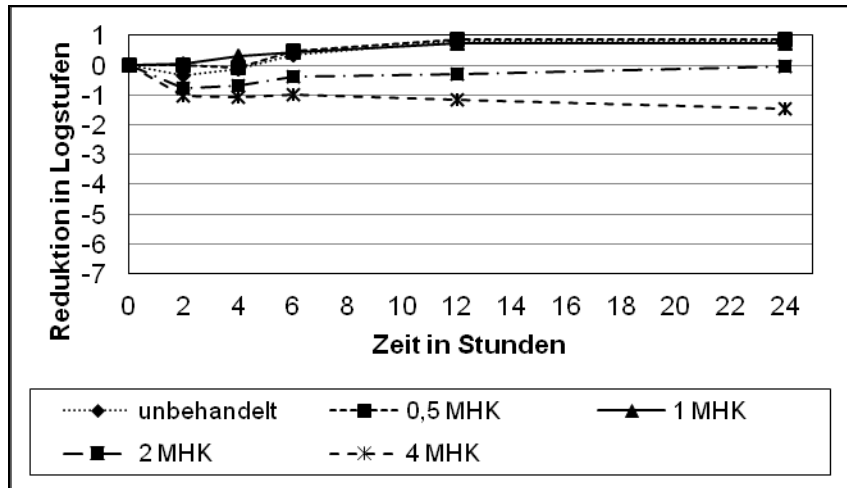


Abb. 45. Absterbekinetik von *B. fragilis* 6791 und Piperacillin/Tazobactam

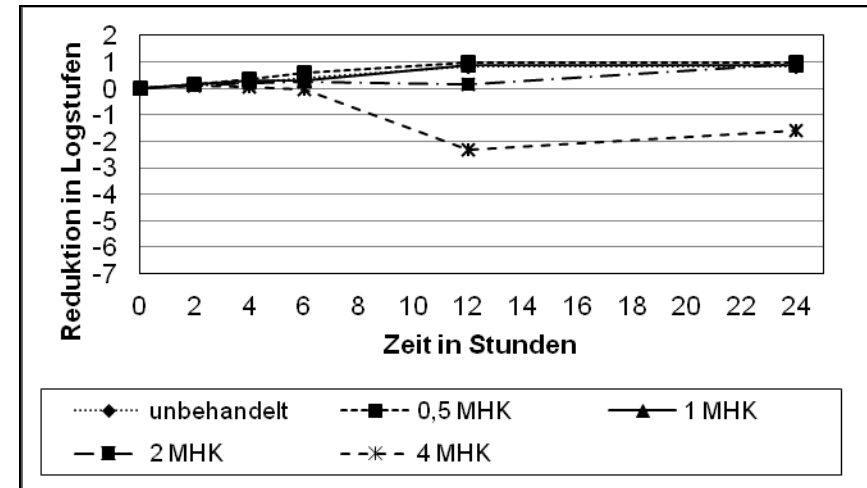


Abb. 46. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13054 und Piperacillin/Tazobactam

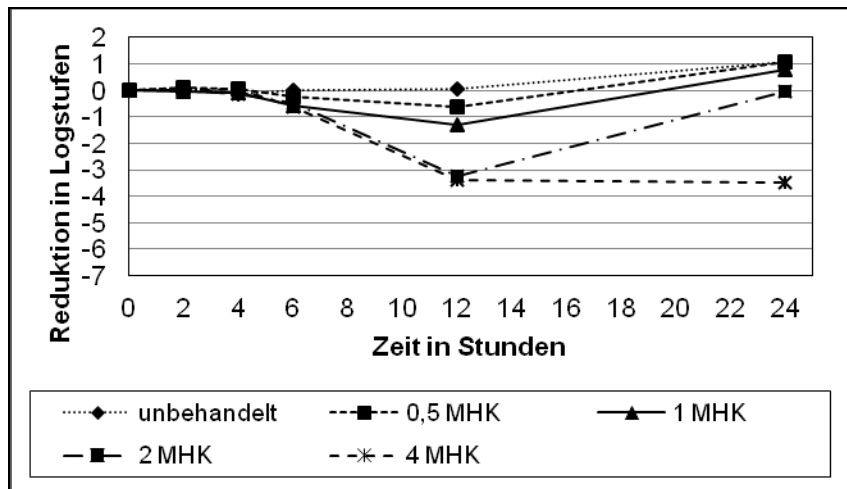


Abb. 47. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13174 und Piperacillin/Tazobactam

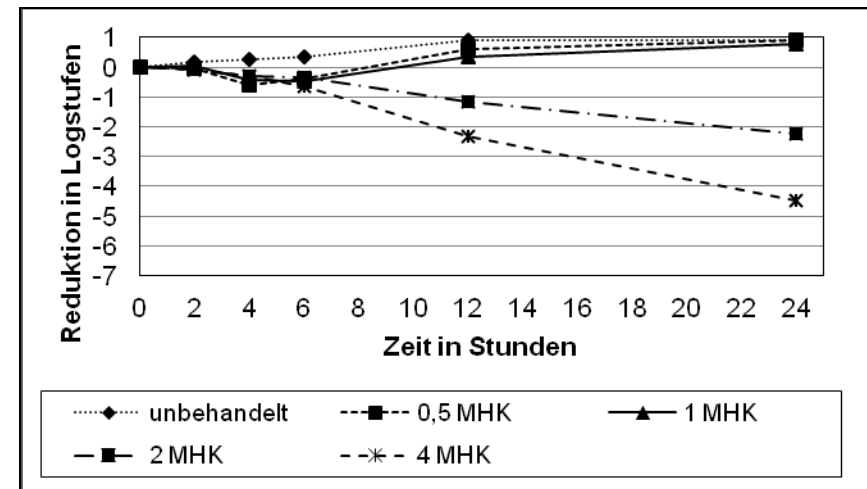


Abb. 48. Absterbekinetik von *B. fragilis* 13267 und Piperacillin/Tazobactam